

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
 United States Patent and Trademark
 Office
 Box PCT
 Washington, D.C.20231
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 22 August 2000 (22.08.00)	
International application No. PCT/JP00/00132	Applicant's or agent's file reference A031-19PCT
International filing date (day/month/year) 13 January 2000 (13.01.00)	Priority date (day/month/year) 14 January 1999 (14.01.99)
Applicant AKIRA, Shizuo et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

27 June 2000 (27.06.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Henrik Nyberg Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

ST

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference A031-19PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/00132	International filing date (day/month/year) 13 January 2000 (13.01.00)	Priority date (day/month/year) 14 January 1999 (14.01.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A01K 67/027, G01N 33/50, 33/15, C12N 15/09		
Applicant JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☒ ~~Non-establishment of opinion with regard to~~ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

2

Date of submission of the demand 27 June 2000 (27.06.00)	Date of completion of this report 20 November 2000 (20.11.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/00132

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/00132

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 35-37

because:

- ☐ the said international application, or the said claims Nos. _____
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☒ the claims, or said claims Nos. 35-37 are so inadequately supported
by the description that no meaningful opinion could be formed.

- ☐ no international search report has been established for said claims Nos. _____

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

- ☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.
- ☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/00132

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	8, 12-34, 38-50	YES
	Claims	1-7, 9-11, 51	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-34, 38-51	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-34, 38-51	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: Osamu A., et al., Immunity, Vol. 9, 1998, p. 143-150

Document 2: Yang R-B. et al., Nature, Vol. 395, 1998, p. 217-219

(1) Reason why Claims 1-7, 9-11 and 51 lack novelty

Document 1 states that pancreatic T cells of the MyD88 knockout mouse produce almost no IFN- γ after intravenous injection with dead Proplionibacterium acnes cells. Based on this statement, the subject matter of these Claims does not appear to be novel.

(2) Reason why Claims 8 and 50 lack an inventive step

Document 2 states that TLR2 functions as a signal receptor for the bacterial cell component response. Preparing a TLR2 knockout mouse by conventional methods (for example, Cappachi M., et al., Trends in Genetics, Vol. 5, No. 3, 1989, p. 70-76) to obtain an animal deficient in the bacterial cell component response is obvious to persons skilled in the art.

(3) Reason why Claims 12-34 lack an inventive step

Because it is clear from document 1 that an MyD88 knockout mouse will have a pathological condition that makes it unresponsive to bacterial cell components, using this mouse to conduct risk-screening of substances associated with diseases is obvious to persons skilled in the art.

(4) Reason why Claims 38-42 lack an inventive step

Because it is clear from document 1 that an MyD88 knockout mouse will have a pathological condition that makes it unresponsive to bacterial cell components, using this mouse to evaluate substances associated with diseases is obvious to persons skilled in the art.

(5) Reason why Claims 43-49 lack an inventive step

Because it is clear from document 1 that an MyD88 knockout mouse will have a pathological condition that makes it unresponsive to bacterial cell components, using this mouse to detect substances associated with diseases is obvious to persons skilled in the art.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/00132

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

In Claims 35-37 there is a chemical substance identified only by the screening method, and the Specification does not sufficiently describe exactly what kind of substance this is.



P C T

E P .  国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)

[P C T 1 8 条、P C T 規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 A 0 3 1 - 1 9 P C T	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(P C T / I S A / 2 2 0) 及び下記 5 を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 0 0 / 0 0 1 3 2	国際出願日 (日.月.年) 1 3 . 0 1 . 0 0	優先日 (日.月.年) 1 4 . 0 1 . 9 9
出願人 (氏名又は名称) 科学技術振興事業団		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (P C T 1 8 条) の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☐ 出願人が提出したものを承認する。

☒ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条 (P C T 規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 1 5 図とする。 ☒ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

第Ⅲ欄 要約 (第1ページの5の続き)

インビボにおける細菌菌体成分刺激によるシグナル伝達に対する TLRファミリー各メンバーの関わり、特に TLR2 や MyD88 のインビボにおける役割を明らかにする上で有用なペプチドグリカン、リポタンパク・リポペプチド等に対して不応答性であるノックアウトマウスである。TLR2 又は MyD88 遺伝子の細胞内領域等を含むエクソン部位の全部または一部の遺伝子フラグメントを、ポリAシグナルとマーカー遺伝子をもつプラスミドに置換することにより構築したターゲッティングベクターを用いた相同組み換え法により作製する。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ A01K 67/027, G01N 33/50, G01N33/15,
C12N 15/09

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ A01K 67/027, G01N 33/50, G01N33/15,
C12N 15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS, MEDLINE, WPIDS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Osamu A. et al., Immunity, vol.9, p.143-150 (1998)	1-7, 9-11, 35, 36, 51 8, 12-34, 37-50
X Y	Akira S., 日本免疫学会・学術集会記録(1998)第28巻, 第3頁	1-7, 9-11, 35, 36, 51 8, 12-34, 37-50

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.04.00

国際調査報告の発送日

18.04.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長 井 啓 子



2B

9123

電話番号 03-3581-1101 内線 3236



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	河合太郎ら, 日本免疫学会・学術集会記録(1998)第28巻, 第280頁	1-7, 9-11, 35, 36, 51 8, 12-34, 37-5 0
X Y	河合太郎ら, 第21回日本分子生物学会年会・プログラム・講演要 旨集(1998), 第184頁	1-7, 9-11, 35, 36, 51 8, 12-34, 37-5 0
PX PY	Takeuchi O. et al., Immunity, vol.11, p.443-451 (1999)	1-8, 12, 13, 2 6, 50 9-11, 14-25, 2 7-49, 51
PX PY	Kawai T. et al., Immunity, vol.11, p.115-122 (1999)	1-7, 9-11, 35, 36, 51 8, 12-34, 37-5 0
X	Hardiman G. et al., Genomics, vol.45, p.332-339 (1997)	9, 51
X	Yang R-B. et al., Nature, vol.395, p.284-288 (1998)	8, 50
X	Kirsching C.J. et al., J.Exp.Med., vol.188, p.2091-2097 (1998)	8, 50
A	Gerard C. et al., Nature, vol.395, p.217-219 (1998)	1-51
Y	Michalek S.M. et al., Journal of Infectious Diseases, vol.141, p.55-63 (1989)	4, 5
Y	Harbour D.V. et al., Brain, Behavior, and Immunity, vol.1, p.123-133 (1987)	4, 5



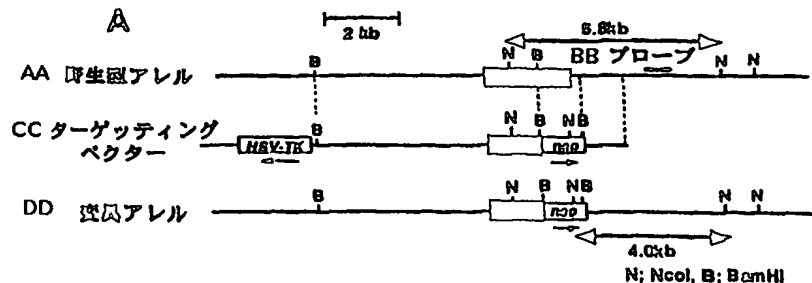
(51) 国際特許分類7 A01K 67/027, G01N 33/50, 33/15, C12N 15/09		A1	(11) 国際公開番号 WO00/41561
		(43) 国際公開日 2000年7月20日(20.07.00)	
(21) 国際出願番号 PCT/JP00/00132		竹田 潔(TAKEDA, Kiyoshi)[JP/JP] 〒562-0031 大阪府箕面市小野原東五丁目5番O棟202 Osaka, (JP)	
(22) 国際出願日 2000年1月13日(13.01.00)		(74) 代理人 廣田雅紀(HIROTA, Masanori) 〒107-0052 東京都港区赤坂二丁目8番11号 第11赤坂葵ビル502 Tokyo, (JP)	
(30) 優先権データ 特願平11/7365 1999年1月14日(14.01.99) JP 特願平11/228282 1999年8月12日(12.08.99) JP 特願平11/309238 1999年10月29日(29.10.99) JP		(81) 指定国 AU, CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)	
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP] 〒332-0012 埼玉県川口市本町四丁目1番8号 Saitama, (JP)		添付公開書類 国際調査報告書 不利にならない開示又は発明の新規性の喪失の例外に関する陳述。	
(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 番良静男(AKIRA, Shizuo)[JP/JP] 〒562-0031 大阪府箕面市小野原東六丁目17番18号202 Osaka, (JP) 竹内 理(TAKEUCHI, Osamu)[JP/JP] 〒562-0031 大阪府箕面市小野原東四丁目19番3号201 Osaka, (JP)			

(54) Title: BACTERIAL CELL COMPONENT-UNRESPONSIVE MODEL MOUSE

(54) 発明の名称 細菌菌体成分不応答性モデルマウス

(57) Abstract

A knockout mouse unresponsive to peptidoglycans, lipoproteins, lipopeptides, etc. which are useful in clarifying the role of each member of the TLR family (in particular, TLR2 and MyD88) in the signal transduction due to stimulation with bacterial cell components *in vivo*. This knockout mouse is prepared by the homologous recombination method with the use of a targeting vector constructed by substituting the whole gene fragment or a part thereof of the exon site containing the intracellular region of TLR2 or MyD88 gene by a plasmid having poly(A) signal and a marker gene.



AA...WILD TYPE ALLELE
BB...PROBE
CC...TARGETING VECTOR
DD...VARIANT ALLELE

インビボにおける細菌菌体成分刺激によるシグナル伝達に対する TLRファミリー各メンバーの関わり、特に TLR 2 や MyD88 のインビボにおける役割を明らかにする上で有用なペプチドグリカン、リポタンパク・リポペプチド等に対して不応答性であるノックアウトマウスである。TLR 2 又は MyD88 遺伝子の細胞内領域等を含むエクソン部位の全部または一部の遺伝子フラグメントを、ポリ A シグナルとマーカー遺伝子をもつプラスミドに置換することにより構築したターゲッティングベクターを用いた相同組み換え法により作製する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサオ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	MN	モンゴル	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MX	メキシコ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MZ	モザンビーク	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NL	オランダ	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノールウェー	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	KR	韓国				

明 細 書

細菌菌体成分不応答性モデルマウス

5 技術分野

本発明は、マイコプラズマ属、スピロヘータ属、エセリシア属等に属する細菌の菌体成分であるリポタンパク／リポペプチドや、グラム陽性菌の細胞壁画分であるペプチドグリカンやグラム陰性菌の細胞壁画分であるエンドトキシン等の細菌菌体成分に不応答性のモデル非ヒト動物に関し、またこれら細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物を用いた細菌感染症に対する抑制物質又は促進物質や、TLR2に対するアゴニストやアンタゴニストのスクリーニング方法等に関する。

背景技術

免疫反応や感染時の応答、造血、ウイルス感染や腫瘍細胞の障害に重要な役割を果たしている細胞間シグナル伝達物質であるサイトカインの中でも、リンパ球間でシグナルを伝え合うサイトカインはインターロイキン（以下「IL」という）と呼ばれている。このILの中で、IL-1は、様々な免疫反応や炎症反応を介しているサイトカインであり、生体の恒常性維持に関与し、感染時や傷を受けた際に単球、マクロファージ、ケラチノサイト、血管内皮細胞等種々の細胞から産生される。IL-1には、同一のレセプターに結合するIL-1 α とIL-1 β の2種類が存在することが知られている。また、IL-1は、T細胞の抗原やマイトジェンによる活性化の際に同時に働き、T細胞からIL-2を分泌させIL-2レセプターの発現を増強してT細胞の増殖を誘導することや、単球やマクロファージに作用しTNF- α 、IL-1、IL-6

の産生を誘導することにも知られている。

IL-1には、その受容体である2種類のIL-1レセプター（以下「IL-1R」という）があり、タイプI及びタイプIIのどちらのIL-1Rもイムノグロブリン様ドメインが細胞外ドメインに3カ所存在し、

5 タイプIレセプターはT細胞や結合組織で、タイプIIレセプターは脾臓B細胞や骨髄細胞等で発現され、タイプIレセプターはNF- κ Bを核内で誘導することが知られている。また、IL-1RにIL-1 α やIL-1 β と同程度の親和力で結合するが、生物活性を有さないIL-1レセプターアンタゴニスト（以下「IL-1ra」という）があり、

10 IL-1のIL-1Rへの結合を競合的に阻害することにも知られている。

IL-18は、インターフェロン- γ （以下「IFN- γ 」という）の生成を促進し、ナチュラルキラー細胞の活性を高め、IL-12と共働してT細胞からIFN- γ の生成を誘導し、Th1（IL-2産生性ヘルパーT細胞）応答における重要な役割を果たすことや、機能が似て

15 いるIL-12とは構造的に異なり、IL-1とは類似の構造を有することが知られている。また、IL-18は、IL-1 β の場合と同様に、その成熟化のためにIL-1 β 変換酵素（ICE）/カスパーゼ1による分割を必要とする不活性先駆体として産生され、またIL-1R関連キナーゼ（IRAK）及びNF- κ Bを活性化することにも知られてい

20 る。

また、これまでにIL-1Rと相同性を示す分子が複数同定されており、現在これらIL-1Rファミリーを介するシグナル伝達経路が盛んに研究されている。MyD88は、IL-1R相同領域とDeathドメインからなる細胞質内タンパク質であり、IL-1刺激後のIL-1

25 RコンプレックスへIRAKを取込んで、NF- κ Bを活性化するアダプター分子として機能することにも知られている。また、MyD88遺伝

子は、当初、IL-6による刺激分化により、骨髄白血球細胞M1をマクロファージへ速やかに誘導する骨髄細胞分化初期応答遺伝子として分離されたことも知られている。

また、グラム陰性細菌表層のペプチドグリカンを取り囲んで存在する
5 外膜の重要構成成分であるリポ多糖からなる菌体内毒素はエンドトキシンと呼ばれ、リポ多糖はリピドAと呼ばれる脂質とこれに共有結合した各種の糖から構成されることが知られている。そして、このエンドトキシンは、主として発熱、白血球や血小板の減少、骨髄出血壊死、血糖低下、IFN誘発、Bリンパ球（骨髄由来免疫応答細胞）の活性化等の生物活性を有することも知られている。
10

一方、Toll (Toll) 遺伝子は、ショウジョウバエの胚発生中の背腹軸の決定 (Cell 52, 269-279, 1988, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 12, 393-416, 1996)、また成体における抗真菌性免疫応答に必要であることが知られている (Cell 86, 973-983, 1996)。かかるTollは、細胞外
15 領域にロイシンリッチリピート (LLRR) を有するI型膜貫通受容体であり、この細胞質内領域は、哺乳類インターロイキン-1受容体 (IL-1R) の細胞質内領域と相同性が高いことが明らかとなっている (Nature 351, 355-356, 1991, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 12, 393-416, 1996, J. Leukoc. Biol. 63, 650-657, 1998)。他のTollファミリーメン
20 ンバーである18-wheelerは、抗菌ホスト防御に関わっているが抗真菌性免疫応答には関わらないことが明らかになっており、Toll経路の選択的活性を介し、ショウジョウバエにおいて特定の病原体が特異的抗菌性免疫応答を誘導することも明らかとなっている (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 14614-14619, 1997, EMBO J. 16, 6120-6130, 1997, Curr. Opin. Immunol. 11, 13-18, 1999)。
25

近年、Toll様受容体 (TLR) と呼ばれるTollの哺乳類のホ

モログが同定され、T L R 2 や T L R 4 など現在までに 6 つのファミリーが報告されている (Nature 388, 394-397, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 588-593, 1998, Blood 91, 4020-4027, 1998, Gene 231, 59-65, 1999)。この T L R ファミリーは、上記 I L - 1 R と同様にシグナル伝達分子としてのアダプタータンパク質である前記 M y D 8 8 を介し、I L - 1 R 結合キナーゼ (I R A K) をリクルートし、T R A F 6 を活性化し、下流の N F - κ B を活性化することが知られている (J. Exp. Med. 187, 2097-2101, 1998, Mol. Cell 2, 253-258, 1998, Immunity 11, 115-122, 1999)。また、哺乳類における T L R ファミリーの役割は、細菌の共通構造を認識するパターン認識受容体 (P R R : pattern recognition receptor) として、先天的な免疫認識に関わっているとも考えられている (Cell 91, 295-298, 1997)。

上記 P R R により認識される病原体会合分子パターン (P A M P : pathogen-associated molecular pattern) の一つは、グラム陰性菌の外膜の主成分であるリポ多糖 (L P S) であって (Cell 91, 295-298, 1997)、かかる L P S が宿主細胞を刺激して宿主細胞に T N F - α 、I L - 1 及び I L - 6 等の各種炎症性 (proinflammatory) サイトカインを産生させること (Adv. Immunol. 28, 293-450, 1979, Annu. Rev. Immunol. 13, 437-457, 1995) や、L P S 結合タンパク質 (L B P : LPS-binding protein) により捕獲された L P S が細胞表面上の C D 1 4 に引き渡されることが知られている (Science 249, 1431-1433, 1990, Annu. Rev. Immunol. 13, 437-457, 1995)。しかしながら、C D 1 4 は膜貫通ドメインのないグリコシルホスファチジルイノシトール (G P I) アンカータンパク質であり、L P S に対する真のシグナル伝達受容体の存在が考えられている。

上記 T L R ファミリーに属する T L R 4 はグラム陰性菌菌体成分であ

る L P S のシグナル伝達分子であり、かかる T L R 4 をトランスフェクションすると、N F - κ B の持続的低活性化をもたらす (J. Exp. Med. 188, 2091-2097, 1998、Nature 395, 284-288, 1998)。他方、T L R 2 もインビトロでヒト胎児腎臓 2 9 3 細胞 (human embryonic kidney 293 cells) に過剰発現させると L P S のシグナルを細胞内に伝えることから、L P S レセプターの候補であると考えられていた。また、Godawski のグループは、ヒト T L R 2 が C D 1 4 と相互作用して L P S 受容体複合体を形成すると報告している (J. Immunol. 163, 639-643, 1999)。L P S での刺激処理は受容体をオリゴマー化し、次に I R A K を受容体複合体に動員する。これとは対照的に、Poltorak らと Qureshi らのグループは、ポジショナルクローニング法により、T L R 4 が C 3 H / H e J マウスの L P S 低応答性に関する原因遺伝子 (causative gene)、すなわち L p s 遺伝子であることを報告している (Science 282, 2085-2088, 1998、J. Exp. Med. 189, 615-625, 1999)。

15 本発明者らは、T L R 4 が実際に L P S シグナル伝達に関わっていることを T L R 4 欠損マウスを作製することにより明らかにしている (J. Immunol. 162, 3749-3752, 1999) が、これは T L R の一次構造における種特異的差異によるもの、つまりマウスでは T L R 4、ヒトでは T L R 2 により介されている可能性がある。しかしながら、マウス T L R 2

20 も L P S に対する応答で N F - κ B を活性化したとの報告がある (J. Immunol. 162, 6971-6975, 1999)。また、Chow らは、C 3 H / H e J マウスに関する結果と一致する結果、すなわちヒト T L R 4 が投与量依存又は時間依存による L P S / C D 1 4 に対する刺激によって N F - κ B を介する遺伝子発現を活性化し、ヒト 2 9 3 細胞を用いた場合には

25 Kirschning らのグループと矛盾する結果を得て、これは 2 9 3 細胞のロットの差にもよるものと推測されると報告している。(J. Biol. Chem.

274, 10689-10692, 1999)。

最近、T L R 2 がグラム陰性菌由来のL P S に対する反応性のみに関わっているのではなく (J. Immunol. 162, 6971-6975, 1999)、別の共通細菌構造パターンであるグラム陽性菌由来のペプチドグリカン(P G N)

- 5 とリポテイコ酸 (L T A) のシグナル伝達受容体として作用するとの報告がある(J. Biol. Chem. 274, 17406-17409, 1999, J. Immunol. 163, 1-5, 1999)。また、全グラム陽性菌、可溶性 P G N 及び L T A が、T L R 2 を発現する 2 9 3 細胞の N F - κ B 活性化を誘導したのに対して、T L R 1 や T L R 4 を発現する細胞内の N F - κ B 活性化を誘導しなかった
- 10 ことも報告されている (J. Biol. Chem. 274, 17406-17409, 1999)。また、T L R 4 ではなくヒト T L R 2 を発現するチャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 繊維芽細胞を、熱殺菌したスタフィロコッカス・アウレウス (Staphylococcus aureus) 及びストレプトコッカス・ニューモニエ (Streptococcus pneumoniae) 並びにスタフィロコッカス・アウレウス
- 15 由来 P G N により同様に活性化したとの報告がなされている (J. Immunol. 163, 1-5, 1999)。

- 他方、動物やヒトの病原性細菌として知られるマイコプラズマは細胞壁を欠如しているが、マクロファージを活性化する能力を備えている。これらマクロファージ活性化物質がリポタンパク／リポペプチドである
- 20 との数多くの報告が現在までになされており、かかるリポペプチドのうちの 1 つであるマイコプラズマ・ファーメンタンス (M. fermentans) 由来の 2 k D マクロファージ活性化リポペプチド M A L P - 2 は、その生化学的特性が明らかになっており、かつ合成されたものも利用することができる (J. Exp. Med. 185:1951, 1997)。この脂質種は 2 つの不斉炭素原子
- 25 をもち、S, R ラセミ体からなる合成 M A L P - 2 はインビトロでピコモル濃度で天然化合物作用と類似の特異活性を示すことが知られてい

る。そして、MALP-2がNF- κ Bを活性化することを除いては、MALP-2のシグナル経路や細胞表面レセプターについては殆ど知られていない。

その他、マイコバクテリウム (mycobacterium) とボレリア・ブルグドルフェリ (Borrelia burgdorferi) 由来のリポタンパク/リポペプチドが、インビトロでのTLR2を介する宿主細胞の活性化を誘導したことが報告されている (Science 285, 736-739, 1999、Science 285, 732-736, 1999)。しかしながら、過剰発現実験から得られる結果は必ずしもインビボでのTLRファミリーの機能を反映していない。このような応答性をNF- κ B活性化に基づいて分析した結果も、これら刺激により仲介される生物学的応答には関連しない (Infect. Immun. 66, 1638-1647, 1998) と報告されている。

また、人工的に遺伝子を導入し発現させるトランスジェニックマウスと、胚性幹細胞 (以下「ES細胞」という) を用いて人工的にゲノム上の特定遺伝子を相同組換えにより変化させる遺伝子ターゲティングとを用いた遺伝子欠損マウスを用いると、特定の遺伝子の機能を個体レベルで解析しうることが知られている。そして、一般に、遺伝子欠損マウスはノックアウトマウスと呼ばれているが、TLR2ノックアウトマウスやMyD88ノックアウトマウスは知られていない上に、TLR2ノックアウトマウスやMyD88ノックアウトマウスが細菌菌体成分に対して不応答性であることも知られていなかった。

発明の開示

インビボにおける細菌菌体成分に対する応答は、細胞表面上の各TLRの発現レベルの差異により変化することが予測されるものの、未だインビボにおける細菌菌体成分刺激によるシグナル伝達に対するTLRフ

- ファミリーの各メンバーやT L R ファミリーのアダプタータンパク質であるM y D 8 8 の関わりは明らかにされていない。本発明の課題は、インビボにおける細菌菌体成分刺激によるシグナル伝達に対するT L R ファミリー各メンバーやT L R ファミリーのアダプタータンパク質であるM
- 5 y D 8 8 の関わり、特にT L R 2 とM y D 8 8 とのインビボにおける役割を明らかにする上で有用な、マイコプラズマ属、スピロヘータ属、エセリシア属等に属する細菌の菌体成分であるリポタンパク／リポペプチドや、グラム陽性菌の細胞壁成分であるペプチドグリカンやグラム陰性菌の細胞壁成分であるエンドトキシン等の細菌菌体成分に不応答性のモデル非ヒト動物、例えばT L R 2 及びM y D 8 8 遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物や、またこれら細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物を用いた細菌感染症に対する抑制物質又は促進物質や、T L R 2 に対するアゴニストやアンタゴニストのスクリーニング方法等を提供することにある。
- 15 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究した結果、プラスミドベクターを用いてE S 細胞で相同的組換えによって、T L R 2 遺伝子の細胞内領域を含むエキソン領域、又はM y D 8 8 遺伝子領域のC末端部分をコードした2つのエキソン領域を、それぞれネオマイシン耐性遺伝子に置き換え、またそれぞれのC末端側にH S V - t k 遺伝子を導入
- 20 させて、G 4 1 8 とガンシクロビアに対して2重に抵抗力のあるE S 細胞クローンをスクリーニングし、このE S 細胞クローンをC 5 7 B L / 6 のマウスの胚盤胞(blastocysts)の中に注入し、その生殖系列をとおして、メンデルの法則に従い出生してくるT L R 2 又はM y D 8 8 遺伝子機能が染色体上で欠損したT L R 2 ノックアウトマウスやM y D 8 8 ノ
- 25 ックアウトマウスが、生まれてから20週間は明らかに異常を示さないトランスジェニックマウスであり、また、かかるT L R 2 ノックアウト

マウスやMyD88ノックアウトマウスがグラム陽性菌の細胞壁成分であるペプチドグリカンやリポタンパク／リポペプチド等の細菌菌体成分に対して不応答性であることを見出し、本発明を完成するに至った。

- すなわち本発明は、細菌菌体成分であるリポタンパク／リポペプチド
- 5 に対して不応答性であることを特徴とする細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物（請求項1）や、リポタンパク／リポペプチドが、マイコプラズマ属に属する細菌に由来するマクロファージ活性化リポペプチドであることを特徴とする請求項1記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物（請求項2）や、細菌菌体成分であるペプチドグリカンに対して
- 10 不応答性であることを特徴とする請求項1又は2記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物（請求項3）や、グラム陽性菌細胞壁画分に対して低応答性であることを特徴とする請求項1～3のいずれか記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物（請求項4）や、細菌菌体成分であるエンドトキシンに対して不応答性であることを特徴とする請求項1
- 15 ～4のいずれか記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物（請求項5）や、細菌菌体成分であるリポテイコ酸に対して不応答性であることを特徴とする請求項1～5のいずれか記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物（請求項6）や、細菌菌体成分である結核菌溶解物に対して不応答性であることを特徴とする請求項1～6のいずれか記載の細菌
- 20 菌体成分不応答性モデル非ヒト動物（請求項7）や、請求項1～4のいずれか記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物が、TLR2遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物であることを特徴とする細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物（請求項8）や、請求項1～7のいずれか記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物が、MyD88遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物であることを特徴とする細菌菌
- 25 体成分不応答性モデル非ヒト動物（請求項9）や、非ヒト動物が、齧歯

目動物であることを特徴とする請求項 1 ～ 9 のいずれか記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物（請求項 10）や、齧歯目動物が、マウスであることを特徴とする請求項 10 記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物（請求項 11）に関する。

- 5 また本発明は、請求項 1 ～ 11 のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞と被検物質とをあらかじめインビトロで接触せしめた後、該マクロファージ又は脾臓細胞を細菌菌体成分の存在下で培養し、該マクロファージ又は脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価
- 10 することを特徴とする細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 12）や、請求項 1 ～ 11 のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞と細菌菌体成分とをあらかじめインビトロで接触せしめた後、該マクロファージ又は脾臓細胞を被検物質の存在
- 15 下で培養し、該マクロファージ又は脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することを特徴とする細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 13）や、請求項 1 ～ 11 のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物にあらかじめ被検物質を投与した後、該非ヒト動物
- 20 から得られるマクロファージ又は脾臓細胞を細菌菌体成分の存在下で培養し、該マクロファージ又は脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することを特徴とする細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 14）や、請求項 1 ～ 11 のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である
- 25 非ヒト動物にあらかじめ被検物質を投与した後、該非ヒト動物を細菌により感染させ、該非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞

- のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することを特徴とする細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 1 5）や、請求項 1 ～ 1 1 のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物をあらかじめ細菌により
- 5 感染させた後、該非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞を被検物質の存在下で培養し、該マクロファージ又は脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することを特徴とする細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 1 6）や、請求項 1 ～ 1 1 のいずれか記載の細菌菌体成分
- 10 に対して不応答性である非ヒト動物をあらかじめ細菌により感染させた後、該非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することを特徴とする細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 1 7）や、請求項 1
- 15 ～ 1 1 のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物にあらかじめ被検物質を投与した後、該非ヒト動物を細菌により感染させ、該非ヒト動物におけるマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することを特徴とする細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 1 8）や、請求項 1
- 20 ～ 1 1 のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物をあらかじめ細菌により感染させた後、該非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物におけるマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することを特徴とする細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 1 9）や、マクロフ
- 25 ージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価するに際し、対照として細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物と同種の野生型非ヒ

- ト動物の測定値と比較・評価することを特徴とする請求項 12～19 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 20）や、マクロファージ活性の程度の測定・評価が、該マクロファージにおけるサイトカイン及び／又は亜硝酸
- 5 イオンの産生量の測定・評価であることを特徴とする請求項 12～20 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 21）や、脾臓細胞活性の程度の測定・評価が、該脾臓細胞における MHC クラス II の発現量の測定・評価であることを特徴とする請求項 12～20 のいずれか記載の細菌菌体成分に
- 10 対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 22）や、細菌菌体成分が、リポタンパク／リポペプチドであることを特徴とする請求項 12～22 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 23）や、リポタンパク／リポペプチドが、マイコプラズマ属、スピロヘータ属又は
- 15 エセリシア属に属する細菌の菌体成分由来のリポタンパク／リポペプチドであることを特徴とする請求項 23 記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 24）や、細菌菌体成分が、ペプチドグリカンであることを特徴とする請求項 12～22 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進
- 20 物質のスクリーニング方法（請求項 25）や、細菌菌体成分が、エンドトキシンであることを特徴とする請求項 12～22 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 26）や、細菌菌体成分が、リポテイコ酸であることを特徴とする請求項 12～22 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性
- 25 の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 27）や、細菌菌体成分が、結核菌溶解物であることを特徴とする請求項 12～22 の

- いずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 28）や、細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質が、細菌感染症に対する抑制物質又は促進物質であることを特徴とする請求項 12～28 のいずれか記載の細菌菌体成分
- 5 に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 29）や、細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質が、TLR2 に対するアゴニスト又はアンタゴニストであることを特徴とする請求項 12～28 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 30）や、細菌菌体成分
- 10 に対する応答性の抑制物質又は促進物質が、インターロイキン-1 活性の抑制物質又は促進物質であることを特徴とする請求項 12～28 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 31）や、細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質が、インターロイキン-18 活性の抑制物質又は
- 15 促進物質であることを特徴とする請求項 12～28 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 32）や、細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質が、IFN- γ 活性の抑制物質又は促進物質であることを特徴とする請求項 12～28 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 33）や、細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質が、TNF- α 活性の抑制物質又は促進物質であることを特徴とする請求項 12～28 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 34）に関する。
- 20
- 25 また本発明は、請求項 12～34 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法により得られ

ることを特徴とする細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質（請求項 3 5）や、細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質が、細菌感染症に対する抑制物質又は促進物質であることを特徴とする請求項 3 5 記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質（請求項 3 6）や、細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質が、T L R 2 に対するアゴニスト又はアンタゴニストであることを特徴とする請求項 3 5 記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質（請求項 3 7）に関する。

また本発明は、請求項 1 ～ 1 1 のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物に被検物質を投与して、該被検物質の生物活性を評価することを特徴とする被検物質の評価方法（請求項 3 8）や、請求項 1 ～ 1 1 のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物と、該非ヒト動物の野生型非ヒト動物とにそれぞれ被検物質を投与して、該被検物質の生物活性を比較・評価することを特徴とする被検物質の評価方法（請求項 3 9）や、生物活性がエンドトキシン活性であることを特徴とする請求項 3 8 又は 3 9 記載の被検物質の評価方法（請求項 4 0）や、生物活性がインターロイキン-1 活性であることを特徴とする請求項 3 8 又は 3 9 記載の被検物質の評価方法（請求項 4 1）や、生物活性がインターロイキン-1 8 活性であることを特徴とする請求項 3 8 又は 3 9 記載の被検物質の評価方法（請求項 4 2）に関する。

また本発明は、請求項 1 ～ 1 1 のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物に被検物質を投与して、該被検物質中の細菌菌体成分を検出することを特徴とする細菌菌体成分の検出方法（請求項 4 3）や、請求項 1 ～ 1 1 のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物と、該非ヒト動物の野生型非ヒト動物とにそれぞれ被検物質を投与して、該被検物質中の細菌菌体成分を検出すること

を特徴とする細菌菌体成分の検出方法（請求項 4 4）や、細菌菌体成分が、リポタンパク／リポペプチドであることを特徴とする請求項 4 3 又は 4 4 記載の細菌菌体成分の検出方法（請求項 4 5）や、リポタンパク／リポペプチドが、マイコプラズマ属、スピロヘータ属又はエセリシア属に属する細菌の菌体成分由来のリポタンパク／リポペプチドであることを特徴とする請求項 4 5 記載の細菌菌体成分の検出方法（請求項 4 6）や、細菌菌体成分が、ペプチドグリカンであることを特徴とする請求項 4 3 又は 4 4 記載の細菌菌体成分の検出方法（請求項 4 7）や、細菌菌体成分が、エンドトキシンであることを特徴とする請求項 4 3 又は 4 4 記載の細菌菌体成分の検出方法（請求項 4 8）や、細菌菌体成分が、リポテイコ酸であることを特徴とする請求項 4 3 又は 4 4 記載の細菌菌体成分の検出方法（請求項 4 9）に関する。

また本発明は、マウス遺伝子ライブラリーからマウス E S T クローン由来のプロープを用いてスクリーニングすることにより得られた T L R 2 遺伝子の細胞内領域を含むエクソン部位の全部又は一部の遺伝子フラグメントを、ポリ A シグナルとマーカー遺伝子をもつプラスミドに置換してターゲッティングベクターを構築し、該ターゲッティングベクターを線状化した後胚幹細胞に導入し、T L R 2 遺伝子機能を欠損した標的胚幹細胞を、マウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションしキメラマウスを作製し、このキメラマウスと野生型マウスとを交配させてヘテロ接合体マウスを作製し、かかるヘテロ接合体マウスをインタークロスすることによって得られることを特徴とする T L R 2 ノックアウトマウス（請求項 5 0）や、マウス遺伝子ライブラリーからマウス E S T クローン由来のプロープを用いてスクリーニングすることにより得られた M y D 8 8 遺伝子領域の C 末端部分をコードした 2 つのエクソン領域の全部又は一部の遺伝子フラグメントを、ポリ A シグナルとマーカー遺伝子を

もつプラスミドに置換してターゲティングベクターを構築し、該ターゲティングベクターを線状化した後胚幹細胞に導入し、MyD88遺伝子機能を欠損した標的胚幹細胞を、マウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションしキメラマウスを作製し、このキメラマウスと野生型マウスとを交配させてヘテロ接合体マウスを作製し、かかるヘテロ接合体マウスをインタークロスすることによって得られることを特徴とするMyD88ノックアウトマウス（請求項51）に関する。

図面の簡単な説明

10 第1図は、本発明のMyD88ノックアウトマウスと野生型マウスの遺伝子地図を示す図である。

第2図は、本発明のMyD88ノックアウトマウスと野生型マウスに大腸菌由来のLPSを投与した場合の生存率を示す図である。

15 第3図は、本発明のMyD88ノックアウトマウスと野生型マウスにおけるIL-1を介してのT細胞増殖の結果を示す図である。

第4図は、本発明のMyD88ノックアウトマウスと野生型マウスにおけるIL-1誘導による血中のTNF- α とIL-6のレベル結果を示す図である。

20 第5図は、本発明のMyD88ノックアウトマウスと野生型マウスにおけるIL-18を介してのNK細胞の活性化の結果を示す図である。

第6図は、本発明のMyD88ノックアウトマウスと野生型マウスにおけるIL-12とIL-18の刺激によるIFN- γ の産生の結果を示す図である。

25 第7図は、ドミナントネガティブMyD88の突然変異が、IL-18誘導NF- κ B活性及びAP-1活性に関与していることを示す図である。

第 8 図は、本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウス、野生型マウス、
T L R 4 ノックアウトマウスのマクロファージ及び脾臓 B 細胞のサルモ
ネラ・ミネソタ R e - 5 9 5 に対する応答性の結果を示す図である。

第 9 図は、本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウス、野生型マウス、
5 T L R 4 ノックアウトマウスのマクロファージ及び脾臓 B 細胞の I L -
4 やインターフェロノ γ に対する応答性の結果を示す図である。

第 1 0 図は、本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウス、野生型マウス、
T L R 4 ノックアウトマウスのマクロファージ及び脾臓 B 細胞のボルフ
ィロモナス・ジンジバリスに対する応答性の結果を示す図である。

10 第 1 1 図は、本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウス、野生型マウス、
T L R 4 ノックアウトマウスのマクロファージ及び脾臓 B 細胞のエシェ
リキア・コリ O 5 5 : B 5 に対する応答性の結果を示す図である。

第 1 2 図は、本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウス、野生型マウス、
T L R 4 ノックアウトマウスのマクロファージ及び脾臓 B 細胞のペプチ
15 ドグリカンに対する応答性の結果を示す図である。

第 1 3 図は、本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウス、野生型マウス、
T L R 4 ノックアウトマウスのマクロファージ及び脾臓 B 細胞のリポテ
イコ酸に対する応答性の結果を示す図である。

第 1 4 図は、本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウス、野生型マウス、
20 T L R 4 ノックアウトマウスのマクロファージ及び脾臓 B 細胞の結核菌
全細胞溶解物に対する応答性の結果を示す図である。

第 1 5 図は、本発明の T L R 2 ノックアウトマウスと野生型マウスの
遺伝子地図を示す図である。

第 1 6 図は、本発明の T L R 2 ノックアウトマウスと野生型マウスに
25 大腸菌由来の L P S を投与した場合の生存率を示す図である。

第 1 7 図は、本発明の T L R 2 ノックアウトマウス、野生型マウス、

T L R 4 ノックアウトマウスにおけるリピド A 又は L P S 誘導による I L - 6 、 T N F - α 又は N O ₂ ⁻ の産生量を示す図である。

第 1 8 図は、本発明の T L R 2 ノックアウトマウス、野生型マウス、
T L R 4 ノックアウトマウスの脾臓 B 細胞のサルモネラ・ミネソタ R e
5 - 5 9 5 由来 L P S に対する応答性の結果を示す図である。

第 1 9 図は、本発明の T L R 2 ノックアウトマウス、野生型マウス、
T L R 4 ノックアウトマウスの腹腔マクロファージのグラム陽性菌の細胞壁成分に対する応答性の結果を示す図である。

第 2 0 図は、本発明の T L R 2 ノックアウトマウス、野生型マウス、
10 T L R 4 ノックアウトマウスにおける P G N 又は L T A 誘導による I L - 6 、 N O ₂ ⁻ 又は T N F - α の産生量を示す図である。

第 2 1 図は、本発明の T L R 2 ノックアウトマウス、野生型マウス、
T L R 4 ノックアウトマウスにおいて、L P S 又は P G N 刺激によるインビトロでのキナーゼアッセイ、ウエスタンブロット分析及び電気泳動
15 移動度分析の結果を示す図である。

第 2 2 図は、C H 3 / H e J マウスの腹腔マクロファージのリポペプチド M A L P - 2 に対する応答性の結果を示す図である。

第 2 3 図は、ヒト単核細胞のリポペプチド M A L P - 2 に対する応答性の結果を示す図である。

20 第 2 4 図は、本発明の T L R 2 ノックアウトマウス、野生型マウス、
T L R 4 ノックアウトマウス、M y D 8 8 ノックアウトマウスの腹腔マクロファージのリポペプチド M A L P - 2 に対する応答性の結果を示す図である。

第 2 5 図は、本発明の T L R 2 ノックアウトマウス、野生型マウス、
25 T L R 4 ノックアウトマウス、M y D 8 8 ノックアウトマウスにおいて、
リポペプチド M A L P - 2 刺激によるインビトロでのキナーゼアッセイ、

ウエスタンブロット分析及び電気泳動移動度分析の結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明における細菌菌体成分としては、マイコプラズマ属、スピロヘータ属、エセリシア属に属する細菌の菌体成分であるリポタンパク／リポペプチド、細菌細胞壁の骨格構造であるN－アセチルグルコサミンとN－アセチルムラミン酸の繰返し多糖類に比較的短いペプチド鎖が結合したペプチドグリカン、主としてグラム陰性菌の外膜成分として存在するエンドトキシンとも呼ばれるリポ多糖（LPS）、グラム陽性細菌の細胞壁成分であるリポテイコ酸（LTA）、結核菌（*Mycobacterium tuberculosis*）溶解物、グラム陽性菌細胞壁画分等を挙げることができ、また本発明においては、便宜上、上記細菌菌体成分を担持するキャリアや、細菌菌体自体も本発明における細菌菌体成分に含めることとする。

本発明において細菌菌体成分に対する不応答性とは、細菌菌体成分による刺激に対する生体又は生体を構成する細胞、組織若しくは器官の反応性が低下しているか、あるいはほぼ失われていることを意味し、低応答性とは刺激に対する反応性が低下していることを意味する。したがって、本発明において細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物とは、細菌菌体成分による刺激に対して、生体又は生体を構成する細胞、組織若しくは器官の反応性が低下しているか、あるいはほぼ失われているマウス、ラット、ウサギ等のヒト以外の動物をいう。また、細菌菌体成分による刺激としては、細菌菌体成分を生体に投与するインビボでの刺激や、生体から分離された細胞に細菌菌体成分を接触させるインビトロでの刺激等を挙げることができる。そして、本発明における細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物としては、リポタンパク／リポペプチド、ペプチドグリカン、グラム陽性菌細胞壁画分、エンドトキシン、リポテイコ酸、

結核菌溶解物等の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物を挙げることができる、具体的には、T L R 2 ノックアウトマウス等のT L R 2 遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物や、M y D 8 8 ノックアウトマウス等のM y D 8 8 遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物
5 を挙げることができる。

本発明において、M y D 8 8 又はT L R 2 遺伝子機能の染色体上での欠損とは、染色体上のM y D 8 8 又はT L R 2 遺伝子の一部もしくは全部が欠損し、野生型において発現されるM y D 8 8 又はT L R 2 を発現する機能が失われていることをいい、また、M y D 8 8 又はT L R 2 遺
10 伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物としては、M y D 8 8 又はT L R 2 ノックアウトマウスの他、例えばM y D 8 8 又はT L R 2 遺伝子機能が欠損したラット等の齧歯目動物を例示することができる。

本発明における野生型の非ヒト動物とは、上記M y D 8 8 又はT L R 2 遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物と同種の非ヒト動物をい
15 い、マウスの場合を例にとると、メンデルの法則に従い出生してくるF 2 マウスのうち、M y D 8 8 又はT L R 2 非欠損型の同種のマウスをいう。これらF 2 マウスにおける欠損型とその野生型、特に同腹の野生型を同時に実験に供することによって、個体レベルで正確な比較実験をすることができる。上記M y D 8 8 又はT L R 2 遺伝子機能が染色体上で
20 欠損した非ヒト動物の作製方法を、M y D 8 8 又はT L R 2 が欠損したノックアウトマウスを例にとって以下説明する。

M y D 8 8 又はT L R 2 遺伝子は、マウス遺伝子ライブラリーをP C R 法等により増幅し、マウスE S T クローン由来等のプローブを用いてクローニングすることができる。このクローニングされたM y D 8 8 又
25 はT L R 2 遺伝子を組換えD N A 技術により、M y D 8 8 又はT L R 2 遺伝子の全部又は一部、例えばM y D 8 8 又はT L R 2 遺伝子の細胞内

領域を含むエクソン部位の全部又は一部を、ポリ A シグナル遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子等マーカー遺伝子で置換し、5' 末端側にジフテリアトキシン A フラグメント (D T - A) 遺伝子や単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ (H S V - t k) 遺伝子等の遺伝子を導入してターゲットニングベクターを作製し、この作製されたターゲットニングベクターを線状化し、エレクトロポレーション法等により胚幹細胞 (E S 細胞) に導入して培養後、G 4 1 8 やガンシクロビア (G A N C) 等の抗生物質により相同的組換えを起こした E S 細胞を選択する。この選択された E S 細胞が目的とする組換え体かどうかをサザンブロット法等により確認することが好ましい。

上記組換え E S 細胞をマウスの胚盤胞 (blastocysts) 内にマイクロインジェクションし、仮親の子宮に戻すことによってキメラマウスを得ることができる。このキメラマウスは、キメラ率がよいと生まれてくるキメラマウスが雄に片寄るため、野生型の雌と交配させることによってヘテロ組換えマウス (+ / - : F 1) を作出し、そのヘテロ組換えマウスの雄と雌を交配させることによってホモ組換えマウス [F 2 ; 野生型マウス (+ / +)、M y D 8 8 又は T L R 2 ノックアウトマウス (- / -)] を得ることができ、これらはすべてメンデルの法則に従い産み出される。そして、本発明の M y D 8 8 又は T L R 2 ノックアウトマウスが生起しているかどうかを確認する方法としては、例えば、上記の方法により得られたマウスの腹腔マクロファージから R N A を単離してノーザンブロット法等により調べたり、またこのマウスの M y D 8 8 又は T L R 2 の発現をウエスタンブロット法等により調べる方法がある。

作出された M y D 8 8 ノックアウトマウスが細菌細胞壁成分に対して不応答性であることは、例えば、マイコプラズマ属、スピロヘータ属、エセリシア属等に属する細菌の菌体成分であるリポタンパク / リポペプ

チドをMyD88ノックアウトマウスのマクロファージやヒト単核細胞にインビトロで接触せしめ、かかる細胞におけるTNF- α やNO₂⁻の産生量を測定することや、グラム陰性菌の細菌細胞壁成分であるLPSをMyD88ノックアウトマウスに静脈注射等により投与し、発熱、ショック、白血球や血小板の減少、骨髓出血壊死、血糖低下、IFN誘発、Bリンパ球（骨髓由来免疫応答細胞）の活性化等のエンドトキシンの生物活性を測定することや、MyD88ノックアウトマウスのマクロファージと脾臓B細胞に、細菌由来のLPS、又はグラム陽性菌菌体成分であるペプチドグリカン、リポテイコ酸、結核菌溶解物等の存在下において、例えばTNF誘発、脾臓B細胞増殖応答、脾臓B細胞表面でのMHCクラスII抗原の発現を測定することにより確認することができる。

本発明のMyD88ノックアウトマウスは、細菌の菌体成分であるリポタンパク／リポペプチドに不応答性であり、また現在までエンドトキシン低応答性として知られているC3H／HeJマウスよりもエンドトキシン応答性が低下しており、ショック症状は全く認められず、また、MyD88ノックアウトマウスのマクロファージ及び脾臓B細胞は、エンドトキシンに対して不応答性であるばかりでなく、グラム陽性細菌細胞壁成分であるペプチドグリカン、リポテイコ酸、結核菌溶解物等に対しても不応答性であって、他方IL-4やIFN- γ に対して応答性であることから、この細菌菌体成分に対して不応答性であるノックアウトマウスは、リポタンパク／リポペプチド、エンドトキシン、ペプチドグリカン、リポテイコ酸等の作用機序の解明やエンドトキシンショックへの対処方法の確立に有用なモデルとすることができる。

また、作出されたTLR2ノックアウトマウスが細菌細胞壁成分に対して不応答性であることは、例えば、マイコプラズマ属、スピロヘータ属、エセリシア属等に属する細菌の菌体成分であるリポタンパク／リポ

ペプチドをTLR2ノックアウトマウスのマクロファージやヒト単核細胞にインビトロで接触せしめ、かかる細胞におけるTNF- α やNO₂⁻の産生量を測定することや、TLR2ノックアウトマウスのマクロファージや脾臓B細胞に、グラム陽性菌細胞壁画分、グラム陽性菌の細胞壁成分であるペプチドグリカン等の存在下において、TNF誘発、脾臓細胞増殖応答、脾臓B細胞表面でのMHCクラスII抗原の発現等を測定することにより確認することができる。そして、本発明のTLR2ノックアウトマウスは、細菌の菌体成分であるリポタンパク／リポペプチドやペプチドグリカンに不応答性であり、グラム陽性菌細胞壁画分に対して低応答性であって、LPSをはじめとしてLTAやIL-4に対して応答性であることから、上記TLR2ノックアウトマウスは、リポタンパク／リポペプチド、ペプチドグリカン、グラム陽性菌細胞壁画分等の作用機序の解明に有用なモデルとすることができる。

本発明の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物は、細菌菌体成分の作用機序の解明の他、細菌感染症に対する抑制物質若しくは促進物質又はTLR2に対するアゴニスト若しくはアンタゴニストなどの細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質若しくは促進物質のスクリーニングや、各種被検物質の生物活性の評価や、細菌菌体成分の検出等に用いることができる。例えば、細菌感染症に対する抑制物質若しくは促進物質又はTLR2に対するアゴニスト又はアンタゴニストなどの細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質若しくは促進物質のスクリーニング方法を、以下細菌感染症に対する抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法を例にとって説明する。

本発明の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞等と被検物質とをあらかじめインビトロで接触せしめた後、該マクロファージ又は脾臓細胞を細菌菌体成分の存

在下で培養し、該マクロファージ又は脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することによる、細菌感染症に対する予防剤、免疫応答回復・促進剤等をスクリーニングする方法や、本発明の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞と細菌菌体成分とをあらかじめインビトロで接触せしめた後、該マクロファージ又は脾臓細胞を被検物質の存在下で培養し、該マクロファージ又は脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することによる、細菌感染症に対する治療剤、症状改善剤等をスクリーニングする方法を挙げることができる。

- 5 また、本発明の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物にあらかじめ被検物質を投与した後、該非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞を細菌菌体成分の存在下で培養し、該マクロファージ又は脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することによる、細菌感染症に対する予防剤、免疫応答回復・促進剤等をスクリーニングする方法や、本発明の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物にあらかじめ被検物質を投与した後、該非ヒト動物を細菌により感染させ、該非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することによる、細菌感染症に対する予防剤、免疫応答回復・促進剤等をスクリーニングする方法を挙げることができる。

- 15 また、本発明の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物をあらかじめ細菌により感染させた後、該非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞を被検物質の存在下で培養し、該マクロファージ又は脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することによる、細菌感染症に対する治療剤、症状改善剤等をスクリーニングする方法や、本発明の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト

ト動物をあらかじめ細菌により感染させた後、該非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することによる、細菌感染症に対する治療剤、症状改善剤等をスクリーニングする方法を
5 挙げることができる。

さらに、本発明の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物にあらかじめ被検物質を投与した後、該非ヒト動物を細菌により感染させ、該非ヒト動物におけるマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することによる、細菌感染症に対する予防剤、免疫応答回復・
10 促進剤等をスクリーニングする方法や、本発明の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物をあらかじめ細菌により感染させた後、該非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物におけるマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することによる、細菌感染症に対する治療剤、症状改善剤等をスクリーニングする方法を挙げることが
15 できる。

そして、マクロファージ活性の程度の測定・評価方法としては該マクロファージにおけるサイトカイン及び／又は亜硝酸イオンの産生量を測定・評価する方法を、脾臓細胞活性の程度の測定・評価方法としては該脾臓細胞におけるMHCクラスIIの発現量を測定・評価する方法をそれ
20 ぞれ例示することができる。また、マクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価するに際し、対照として細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物の野生型非ヒト動物、特に同腹の野生型非ヒト動物の測定値と比較・評価することが個体差によるバラツキをなくすることができるので好ましい。このことは、本発明の細菌菌体成分に対し
25 て不応答性である非ヒト動物を用いる各種被検物質の生物活性の評価や、細菌菌体成分の検出等においても同様である。

本発明のスクリーニング方法の対象となる抑制物質又は促進物質としては、前記細菌感染症に対する抑制物質若しくは促進物質又はT L R 2に対するアゴニスト若しくはアンタゴニストの他、マイコプラズマ属、スピロヘータ属又はエセリシア属に属する細菌の菌体成分由来のリポタンパク／リポペプチドや、ペプチドグリカン、エンドトキシン、リポテイコ酸、結核菌溶解物等の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質や、インターロイキン－1活性、インターロイキン－18活性、I F N－ γ 活性、T N F－ α 活性等の抑制物質又は促進物質を例示することができる。

- 10 なお、T L R 2に対するアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニングは、上記のように細菌感染症に対する抑制物質又は促進物質のスクリーニングと同様に行えばよいが、T L R 4ノックアウトマウスと一緒に用いることもできる。すなわち、T L R 2ノックアウトマウスとT L R 4ノックアウトマウス、さらに必要に応じて野生型マウスに被検物質をそれぞれ投与して、該T L R 2ノックアウトマウス由来及びT L R 4ノックアウトマウス由来のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を比較評価することにより、T L R 2及び／又はT L R 4に対するアゴニスト又はアンタゴニストをスクリーニングすることもできる。

- 20 本発明の被検物質の評価方法は、本発明の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物に被検物質を投与して、該被検物質の生物活性を評価することを特徴とする。本発明の被検物質の評価方法によると、被検物質の生物活性、例えばエンドトキシン活性、インターロイキン－1活性、インターロイキン－18活性等を実測することができる。例えば、本発明のM y D 8 8ノックアウトマウスを用いて、被検物質のエンドトキシン活性を正確に評価することにより、エンドトキシン拮抗物質等の
- 25 エンドトキシンによるショックや発熱作用を抑制することができる薬剤

の開発に有用な情報を得ることができる。

また、本発明のMyD88ノックアウトマウスを用いて、被検物質のIL-1活性を正確に評価することにより、病態モデルマウスにおけるIL-1の疾患との関わりを検索することができる。このように、被検物質のIL-1活性を正確に評価したり、病態モデルマウスにおけるIL-1の関与を解析することにより、例えば、IL-1発現過多に起因するリウマチ様関節炎、移植片対宿主病、喘息等の疾病を治療することができる薬剤の開発に有用な情報を得ることができる。そして、評価対照となるIL-1活性としては、フィトヘマグルチニン(PHA)、コンカナバリンA(ConA)等のマイトジェンや、低濃度のIL-2との共刺激によるT細胞の増殖誘導活性や、単球やマクロファージに作用してTNF- α 、IL-1、IL-6の産生を誘導する活性などを挙げる
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
130
135
140
145
150
155
160
165
170
175
180
185
190
195
200
205
210
215
220
225
230
235
240
245
250
255
260
265
270
275
280
285
290
295
300
305
310
315
320
325
330
335
340
345
350
355
360
365
370
375
380
385
390
395
400
405
410
415
420
425
430
435
440
445
450
455
460
465
470
475
480
485
490
495
500
505
510
515
520
525
530
535
540
545
550
555
560
565
570
575
580
585
590
595
600
605
610
615
620
625
630
635
640
645
650
655
660
665
670
675
680
685
690
695
700
705
710
715
720
725
730
735
740
745
750
755
760
765
770
775
780
785
790
795
800
805
810
815
820
825
830
835
840
845
850
855
860
865
870
875
880
885
890
895
900
905
910
915
920
925
930
935
940
945
950
955
960
965
970
975
980
985
990
995

そしてまた、本発明のMyD88ノックアウトマウスを用いて、被検物質のIL-1活性を正確に評価することにより、例えば、IL-18の過剰産生に起因するI型糖尿病や移植片対宿主病等の疾病を治療することができる薬剤の開発に有用な情報を得ることができる。そして、評価対照となるIL-18活性としては、IFN- γ の生成を促進する活性、NK細胞活性を高める活性、IL-12と共働してT細胞からIFN- γ の生成を誘導する活性、及びIRAKやNF- κ Bを活性化する作用を挙げる
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
130
135
140
145
150
155
160
165
170
175
180
185
190
195
200
205
210
215
220
225
230
235
240
245
250
255
260
265
270
275
280
285
290
295
300
305
310
315
320
325
330
335
340
345
350
355
360
365
370
375
380
385
390
395
400
405
410
415
420
425
430
435
440
445
450
455
460
465
470
475
480
485
490
495
500
505
510
515
520
525
530
535
540
545
550
555
560
565
570
575
580
585
590
595
600
605
610
615
620
625
630
635
640
645
650
655
660
665
670
675
680
685
690
695
700
705
710
715
720
725
730
735
740
745
750
755
760
765
770
775
780
785
790
795
800
805
810
815
820
825
830
835
840
845
850
855
860
865
870
875
880
885
890
895
900
905
910
915
920
925
930
935
940
945
950
955
960
965
970
975
980
985
990
995

本発明の細菌菌体成分の検出方法によると、本発明の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物に被検物質を投与して、該被検物質中に混在する微量の細菌菌体成分、例えばマイコプラズマ属、スピロヘータ属、エセリシア属等に属する細菌の菌体成分由来のリポタンパク/リポペプチド、エセリシア・コリ、クレブシエラ・ニューモニエ、シュー
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
130
135
140
145
150
155
160
165
170
175
180
185
190
195
200
205
210
215
220
225
230
235
240
245
250
255
260
265
270
275
280
285
290
295
300
305
310
315
320
325
330
335
340
345
350
355
360
365
370
375
380
385
390
395
400
405
410
415
420
425
430
435
440
445
450
455
460
465
470
475
480
485
490
495
500
505
510
515
520
525
530
535
540
545
550
555
560
565
570
575
580
585
590
595
600
605
610
615
620
625
630
635
640
645
650
655
660
665
670
675
680
685
690
695
700
705
710
715
720
725
730
735
740
745
750
755
760
765
770
775
780
785
790
795
800
805
810
815
820
825
830
835
840
845
850
855
860
865
870
875
880
885
890
895
900
905
910
915
920
925
930
935
940
945
950
955
960
965
970
975
980
985
990
995

- ドモナス・アエルギノサ、サルモネラ・チフィムリウム、セラチア・マルセッセンス、フレクスナー赤痢菌、ビブリオ・コレレエ、サルモネラ・ミネソタ、ポルフィロモナス・ジンジバリス等由来のエンドトキシン、スタフィロコッカス・アウレウス、コリネバクテリウム・ジフテリア、
- 5 ノカルジア・コエリアカ等由来のペプチドグリカン、ストレプトコッカス・ニューモニア等由来のリポテイコ酸、結核菌の全細胞溶解物等を検出することができる。

以下に、実施例を挙げてこの発明を更に具体的に説明するが、この発明の技術的範囲はこれら実施例により限定されるものではない。

10 実施例 1 (MyD88 ノックアウトマウスの作製)

- MyD88 遺伝子を 129 / SvJ マウス遺伝子ライブラリー (Stratagene 社製) からスクリーニングし、pBluescript ベクター (Stratagene 社製) 中でサブクローンし、制限酵素マッピング及び DNA シーケンシングにより特定した。ターゲッティングベクター (標的ベ
- 15 クター) は、pMC1-neo(Stratagene 社製)からのネオマイシン耐性遺伝子で、野生型アレルの 1.0 kb 遺伝子断片を置換することにより構築された。置換された遺伝子断片は、IL-1RAcP (受容体補助タンパク) の細胞質ドメインに似ているドメインをコードする 2 つのエクソンを含んでいた。ネオマイシン耐性遺伝子は、1.1 kb の 5' 遺伝子
- 20 断片と 5.2 kb の 3' 遺伝子断片をフランキング配列として有していた。次いで、HSV-tk カセットを遺伝子断片の 3' 端に導入した。線状化された標識ベクターを ES 細胞 E14.1 にトランスフェクションし、G418 及びガンシクロヴィアで選択した。両者に抵抗性を示す 176 個のクローンを、PCR による相同組換えのためにスクリーニ
- 25 グし、図 1 に示すプローブを用いるサザンブロット分析により 33 個を確かめた。

3 個の独立的に同定された標的 E S クローンを、C 5 7 B L / 6 マウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションした。得られたキメラマウスを、ヘテロ接合体マウスを作製するために、C 5 7 B L / 6 雌マウスと交尾させた。ヘテロ接合体マウスは、ホモ接合体マウスを得るため、インタークロスされ、これらのインタークロスから予測されたメンデル比（ $+ / + : + / - : - / - = 52 : 93 : 53$ ）で生まれ、M y D 8 8 欠損マウスを作製することができた。本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウスは健康に育ち、20 週の年齢まで異常を示さなかった。突然変異により M y D 8 8 遺伝子の不活性化が生起していることを確認するため、ノーザンブロット分析を行ったところ、M y D 8 8 m R N A は M y D 8 8 欠損マウスの肝臓及び脾臓からは検出されなかった。また、胸腺、脾臓及びリンパ節中の C D 3、B 2 2 0、C D 4 及び C D 8 のフローサイトメトリーで、リンパ球組成は野生型マウスと比較して M y D 8 8 ノックアウトマウスにおいても変わっていなかった。

15 実施例 2（M y D 8 8 ノックアウトマウスのエンドトキシン不応答性）

本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウス 10 匹に、大腸菌（O 5 5 : B 5）由来の L P S を 1 m g 投与し、その生存率によりエンドトキシン不応答性を調べた。対照として同腹の野生型マウス 10 匹を用いた。結果を図 2 に示す。図 2 より、野生型マウスは L S P に応答し、投与後 4 日ですべて死亡したが、本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウスは、L P S 投与後 4 日では死亡するものではなく、エンドトキシン不応答性であることを確認することができた。

実施例 3（M y D 8 8 ノックアウトマウスの I L - 1 仲介機能の欠失）

本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウスの胸腺細胞 1×10^5 を、T 細胞増殖についての I L - 1 との共刺激物であるフィトヘマグルチニン（P H A） $2 \mu g / m l$ 、コンカナバリン A（C o n A） $2.5 \mu g /$

- m l 又は 2 n g / m l の I L - 2 のそれぞれと、I L - 1 β (Genzyme 社) 1 0 0 U / m l との混合物と共に 9 6 ウェルの培養皿で 7 2 時間培養し、T 細胞を増殖させた。T 細胞の増殖は、細胞内に取り込まれた [³H] チミジンの [³H] 量を測定することにより求めた。その結果、P
- 5 H A、C o n A 又は I L - 2 と I L - 1 β との共存下で培養したとき、同腹子の野生型マウスの胸腺細胞は大いに増殖したが、本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウスの胸腺細胞は細胞増殖の増加がほとんど見られなかった (図 3 参照)。また、胸腺細胞に代えて脾臓 B 細胞を用いても、同じような結果が得られることがわかった。
- 10 また本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウスの胸腺細胞を、ホルボー
- ル 1 2 - ミリスチン酸塩 1 3 - 酢酸塩パラメトキシアンフェタミン (P M A) 1 0 n g / m l 又は C o n A 2 . 5 μ g / m l と I L - 2 (Genzyme 社) 2 0 n g / m l との共存下で上記と同じように培養させ、細胞増殖の増加を見たところ、本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウスの胸腺細胞と、同腹子の野生型マウスの胸腺細胞とは、I L - 2 と P M A や C o
- 15 n A との反応に関しては増殖において差が見られなかった (図 3 参照)。これらのことから、I L - 1 が仲介する T 細胞成長シグナルは、本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウスの胸腺細胞で損なわれていることがわかる。
- 20 本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウスの静脈内に I L - 1 β (Genzyme 社) 1 μ g を注入し、2 時間後肝臓と血清を取り出した。総 R N A をトリゾール試薬 (GIBCO 社) を用いて肝臓から抽出し、この R N A (1 0 μ g) を電気泳動にかけ、ナイロン膜に移して血清アミロイド A (S A A - I)、血清アミロイド P (S A P) 及びハプトグロビン (H
- 25 P) のような急性期蛋白質について、³²P でラベルされた c D N A を用いてノーザンブロット分析を行い、m R N A 発現の I L - 1 の誘導増加

を同腹子の野生型マウスのものと比較したところ、野生型マウスでは誘導の増加が見られたが、MyD88ノックアウトマウスでは見られなかった。

またIL-1が、腫瘍壊死因子(TNF- α)やIL-6のような急性期蛋白質の産生や炎症性のサイトカインを誘導するため、本発明のMyD88ノックアウトマウスと同腹子の野生型マウスから上記の方法で取り出した血清のTNF- α やIL-6の濃度が増加するかどうかをELISAによって測定した。その結果、野生型マウスにおいてはIL-1 β によってTNF- α やIL-6の濃度が増加したが、MyD88ノックアウトマウスではTNF- α やIL-6の濃度がIL-1 β によって増加されることはなかった(図4参照)。

以上のことから、本発明のMyD88ノックアウトマウスでは、IL-1を介する主な生物学的機能が厳格に欠失していることがわかる。

実施例4(MyD88ノックアウトマウスのIL-18仲介機能の欠失)

IL-18がNK細胞の溶解活性を増強することはよく知られている。本発明のMyD88ノックアウトマウス及び同腹子の野生型マウスの脾臓B細胞を、IL-18(林原生化学研究所株式会社)20ng/mlの存在下又は不存在下、 ^{51}Cr でラベルされたマウスリンホーマ細胞(以下「YAC-1」という)標的細胞といっしょに24時間培養し、4時間後ガンマカウンターを用いて上清中の遊離した ^{51}Cr を測定した。その結果、インビトロで脾臓B細胞をIL-18の存在下培養したとき、野生型マウスにおけるYAC-1標的細胞に対する溶解活性は劇的に増強したが、MyD88ノックアウトマウスにおいては増強されることはなかった。なお、IL-18に代えてIL-2を用いた場合には、本発明のMyD88ノックアウトマウスの脾臓B細胞においても溶解活性が増強した(図5参照)。

またインビトロで、本発明のMyD88ノックアウトマウスの脾臓B細胞と同腹子の野生型マウスの脾臓B細胞とを20 ng/mlのIL-18で刺激し、24時間培養し、ELISAによって培養上清におけるIFN- γ の産生について測定した。その結果、野生型マウスにおいて
5 はIFN- γ の産生が誘発されたが、本発明のMyD88ノックアウトマウスではIFN- γ の産生は見られなかった（図5参照）。

95%以上の純度に精製された本発明のMyD88ノックアウトマウスの脾臓T細胞及び同腹子の野生型マウスの脾臓T細胞を、2 ng/mlのIL-12存在下、抗CD3抗体（20 μ g/ml）（PharMingen
10 社）でコーティングされた培養皿で培養し、4日後細胞を採取し、ハンクス平衡塩溶液で洗浄した。洗浄後の細胞（ 2×10^5 ）は、抗CD3抗体（20 μ g/ml）でコーティングされた96ウェルの培養皿で、20 ng/mlのIL-18又は2 ng/mlのIL-12で、24時間再び刺激され培養された。その培養上清でのIFN- γ の濃度はEL
15 ISAによって測定し比較された。その結果、本発明のMyD88ノックアウトマウスの脾臓T細胞は、IL-18に応答したIFN- γ の産生を高めることができないことがわかった（図6参照）。

本発明のMyD88ノックアウトマウス及び同腹子の野生型マウスの腹膜内に、熱で殺されたプロピオン酸菌アクネ（P. acnes）50
20 0 μ gを注入し、7日後脾臓からT細胞を精製した後、20 ng/mlのIL-18の存在下又は非存在下、抗CD3抗体（20 μ g/ml）でコーティングされた96ウェルの培養皿で24時間培養し刺激し、その培養上清におけるIFN- γ の濃度をELISAによって測定した。
また本発明のMyD88ノックアウトマウス及び同腹子の野生型マウスの
25 の静脈内に、カルメット-ゲラン菌（BCG）（共和化学）2 mgを注入し、14日後脾臓からT細胞を精製した後、上記のように24時間培養

し刺激し、 $IFN-\gamma$ の濃度を測定した。その結果、どちらの場合も、野生型マウスにおいては $IL-18$ に応答して高レベルの $IFN-\gamma$ が産生されたが、本発明の $MyD88$ ノックアウトマウスでは $IL-18$ の存在下で $IFN-\gamma$ の産生を高めることはできなかった(図6参照)。

- 5 以上のことから、本発明の $MyD88$ ノックアウトマウスは、 $IL-18$ 欠損マウスと同様に、インビボでの $Th1$ 細胞への発展に欠陥があり、 $IL-18$ を介する主な生物学的活性は完全に欠失していることがわかる。

- 次に、ドミナントネガティブ (dominant negative) $MyD88$ の突然
10 変異が、 $IL-18$ 誘導 $NF-\kappa B$ 活性化も阻害するかどうか検討した。
 $COS-7$ 細胞は、 $NF-\kappa B$ 依存ルシフェラーゼレポーター
(luciferase reporter) 遺伝子と共に $MyD88$ (アミノ酸152から296)
発現ベクターで過渡的にトランスフェクションし、 $IL-18$ 処理後のルシフェラーゼ活性を測定した。 $MyD88$ の共発現
15 (coexpression) は $IL-18$ 誘導活性をほぼ完全に阻害した(図7参照)。

- また $IL-18$ は、 $AP-1$ 依存遺伝情報を活性化することから、 $MyD88$ (アミノ酸152から296) が $IL-18$ 誘導 $AP-1$ 活性化のドミナントネガティブ突然変異としても働くかどうか試験した。
20 $IL-18$ での刺激は $AP-1$ 活性を約3~4倍増加し、この活性化は
 $MyD88$ (アミノ酸152から296) の共発現 (coexpression) で
阻害された(図7参照)。これらの結果は、 $MyD88$ が $NF-\kappa B$ と
 $AP-1$ の $IL-18$ 誘導活性化に関与していることを示している。

- 次に、 $NF-\kappa B$ の $IL-18$ 誘導活性化が $MyD88$ 欠損細胞で見
25 られるかどうかを検討した。 $IL-12$ 及び抗 $CD3$ 抗体の存在下で4
日間培養された脾臓 T 細胞を3時間飢餓状態にした後 $IL-18$ で刺激

した。刺激された細胞から抽出された核を、NF- κ B接合部を含む特定のプローブを用いてゲル移動度シフト(mobility shift)分析を行った。

IL-18誘導NF- κ B DNA接着活性は、野生型細胞からの核抽出物中では検出されたが、MyD88欠損細胞からは検出されなかった。

- 5 他方、野生型あるいはMyD88欠損胸腺細胞をTNF- α で処理すると、ほとんど同レベルのNF- κ B DNA接着活性を生じ、MyD88欠損細胞中の欠損IL-18誘導NF- κ B活性は、NF- κ Bの異常機能あるいは調節低下によるものではないことを示した。

- 10 NF- κ Bの活性化の誘導に加えて、IL-1はC-Jun N末端キナーゼ(JNK)を活性化することが知られている。IL-18がJNKの活性化を誘導するかどうか試験するため、代替としてGST-c-Jun-融合蛋白を使ってインビトロキナーゼ分析を行った。IL-18を使った処理は、野生型マウスのTh1-発達細胞中のJNKの活性化を誘導したが、IL-18誘導JNK活性化はMyD88欠損細胞で
- 15 は見られなかった。反対にJNKの通常の活性がTNF- α で処理したMyD88欠損細胞で見られた。IL-18誘導によるNF- κ B及びJNKの活性は、MyD88欠損マウス中では欠失している。これらの結果は、MyD88がNF- κ B及びJNKのIL-18誘導活性化に必須であることを示している。

- 20 実施例5 (MyD88ノックアウトマウスのマクロファージと脾臓B細胞の細菌細胞壁成分不応答性)

5-1 (TLR4欠損マウスの作製)

- 最近、C3H/HeJマウスがToll様受容体(TLR)4遺伝子のミスセンス点突然変異によりLPSに対して低応答性であることが報告され (Science 282, 2085-8, 1998、J. Exp. Med. 189, 615-625, 1999、
- 25 J. Immunol. 162, 3749-3752, 1999)、また本発明者らによって、TLR

4 欠損マウスのマクロファージと脾臓B細胞がL P Sに低応答性であり、
T L R 4 遺伝子がL P S シグナル伝達に不可欠であることが判明した
(J. Immunol. 162, 3749-3752, 1999)。そこで、T L R 4 欠損マウスと
M y D 8 8 欠損マウスとのマクロファージと脾臓B細胞の細菌細胞壁成分
5 に対する応答性を比較するために、T L R 4 欠損マウス (1 2 9 / O
1 a X C 5 7 B L / 6 から交配したF₂) を文献記載 (J. Immunol. 162,
1999, 3749-3752) のようにジーンターゲティング法により作製した。また、
以下の実施例には、年齢が一致する野生型マウス、T L R 4 欠損マウス
及びM y D 8 8 欠損マウスを使用した。

10 5 - 2 (細菌細胞壁成分の調製)

フェノール抽出し、ゲル濾過法によって精製されたエセリシア・コリ
(*Escherichia coli*) 血清型 O 5 5 : B 5 (シグマ社製)、クレブシェラ・
ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*) (シグマ社製)、シュードモナス・
アエルギノサ (*Pseudomonas aeruginosa*) 血清型 1 0 (シグマ社
15 製)、サルモネラ・チフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) (シグ
マ社製)、セラチア・マルセッセンス (*Serratia marcescens*) (シグマ社
製)、フレクスナー赤痢菌 (*Shigella flexneri*) 血清型 1 A (シグマ社製)、
ビブリオ・コレレエ (*Vibrio cholerae*) 血清型 イナバ 5 6 9 B (シグマ
社製) 等の L P S を購入した。フェノールクロロフォルム石油エーテル
20 抽出法により調製されたサルモネラ・ミネソタ (*Salmonella minnesota*)
R e - 5 9 5 の L P S は購入した (シグマ社製)。また、文献 (FEBS Lett.
332, 1994, 197-201) 記載の方法で、ポルフィロモナス・ジンジバリス
(*Porphyromonas gingivalis*) 3 8 1 の L P S 及びリピド A を調製した。
結核菌の全細胞溶解物は、デュボス培地 (ディフコ社製) で結核菌アオ
25 ヤマ B 株 (N I H J 1 6 3 5) を 1 ヶ月間培養した後、細胞を回収して
リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) で再懸濁し、細胞を超音波処理して調

製した。

5-3 (腹膜マクロファージの調製)

上記作製した野生型マウス、TLR4欠損マウス及びMyD88欠損マウスのそれぞれの腹腔内に4%のチオグリコール酸塩を2mlずつ注入し、3日後に腹膜腔から腹膜滲出細胞を単離し、氷温のハンス緩衝液(Hank's buffered salt solution: HBSS)で洗浄することによって腹膜細胞を得た。この細胞をRPMI 1640培地に浮遊させ、プラスチックシャーレに分注し、37℃で2時間培養し、その後、ハンス緩衝液で洗浄することにより非付着細胞を取り除き、付着細胞を腹膜マクロファージとして以下の実験に使用した。

5-4 (サルモネラ・ミネソタRe-595のLPSに対する不応答性)

上記野生型マウス(野生型)、TLR4欠損マウス(TLR4-/-)、MyD88欠損マウス(MyD88-/-)等のそれぞれの腹膜マクロファージのLPSに対する応答性をサルモネラ・ミネソタRe-595のLPSを用いて調べた。それぞれのマウスの腹膜マクロファージを、種々の濃度(0、0.01、0.1、1、10又は100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)のLPSの存在下で24時間培養して刺激し、LPS応答性のマクロファージから放出される腫瘍壊死因子(TNF- α)の濃度をELISAにより測定した(図8A参照)。この結果から、野生型マウスのマクロファージでのTNF- α の産生は、LPSの投与量に応じて増加するのに対して、TLR4欠損マウスやMyD88欠損マウスでは、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のLPS刺激においてもTNF- α を産生せず、これらがLPS不応答性であることがわかった。

また、サルモネラ・ミネソタRe-595のLPSに対する脾臓B細胞の応答性についても調べてみた。野生型マウス、TLR4欠損マウス、MyD88欠損マウスのそれぞれの脾臓B細胞(1×10^5)を単離し、

- 9 6 ウェルの培養皿内で培養し、種々の濃度（0、0.01、0.1、1、10又は100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）のLPSで脾臓B細胞を刺激した。培養から40時間後に1 μCi の $[^3\text{H}]$ -チミジン（デュポント社製）を添加して更に8時間培養し、 $[^3\text{H}]$ の摂取量を β シンチレーションカウンタ（パッカード社製）で測定した（図8B参照）。この結果から、LPSの刺激により野生型マウスの脾臓B細胞では、LPSの投与量に依存して細胞増殖反応を促進したが、TLR4欠損マウス又はMyD88欠損マウスのどちらの脾臓B細胞においても、LPSによる細胞増殖反応は見られなかった。
- 10 また、フローサイトメトリーにより、Re-595のLPSに対する応答における脾臓B細胞表面の主要組織適合遺伝子複合体（MHC）クラスII（I-A^b分子）の発現について調べてみた。野生型マウス、MyD88欠損マウス及びTLR4欠損マウスのそれぞれの脾臓B細胞（ 1×10^6 ）を種々の濃度（0、0.01、0.1、1、10又は100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）のLPS共存下に48時間培養した。培養後細胞を採取して、フィコエリトリン（phycoerythrin: PE; ファーミンジェン社製）で標識した抗B220抗体、又はビオチン化抗マウスI-A^b抗体（ファーミンジェン社製）に、フルオレセインイソシアネート（FITC; ファーミンジェン社製）で標識したストレプトアビジン
- 15 ジンを結合させたFITC標識化抗体により、それらの細胞表面におけるI-A^b分子に結合させて細胞を染色した。染色した細胞をセルクエスタのソフトウェア（ベクトンディッキンソン社製）により蛍光活性化セルソーターキャリバー（FACS Calibur）で分析した。この結果から、Re-595のLPSは、野生型マウスの脾臓B細胞表面でのI-A^b分子の発現を増大しているのに対し、TLR4欠損マウスやMyD88欠損マウスの脾臓B細胞では、高濃度のLPS（100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）で
- 20
- 25

刺激しても、I-A^b分子の発現は増大しなかった（図8C参照）。以上のことから、TLR4欠損マウスとMyD88欠損マウスは共にサルモネラ・ミネソタRe-595のLPSに対して不応答であることがわかる。

- 5 5-5 (IL-4とIFN- γ に対するTLR4欠損マウス及びMyD88欠損マウスの応答性)

TLR4欠損及びMyD88欠損マウスの脾臓B細胞が全ての刺激物に対して不応答性であるかどうかを調べるため、TLR4欠損マウス及びMyD88欠損マウスの脾臓B細胞の他の刺激物に対する応答性を検討したところ、以下に示すように応答性は損なわれておらず、これらのマウスはLPSに対する応答性が特異的に欠損していることがわかった。

- 野生型マウス、MyD88欠損マウス、及びTLR4欠損マウスのそれぞれの脾臓B細胞 (1×10^5) を単離し、IL-4 (Genzyme社製) 及び抗IgM抗体の共存下又は抗CD40抗体の存在下において40時間培養し、 $[^3\text{H}]$ -チミジン (デュポント社製) を添加して更に8時間培養し、 $[^3\text{H}]$ の取込み量を β シンチレーションカウンターで測定した（図9A参照）。この結果から、TLR4欠損マウス及びMyD88欠損マウスの脾臓B細胞は、IL-4及び抗IgM抗体の混合物、又は抗CD40抗体に対する応答において、野生型マウスの脾臓B細胞と同じ挙動を示した。

- 次に、野生型マウス、MyD88欠損マウス、及びTLR4欠損マウスのそれぞれの脾臓B細胞 (1×10^6) を、100 U/mlのIL-4の存在下又は非存在下において48時間培養しそれらの細胞を刺激した。その後、PE標識抗B220抗体又はFITC標識抗マウスI-A^b抗体により、脾臓B細胞表面のI-A^b分子と結合させて細胞を染色し、セルクエスト・ソフトウェアを用いて蛍光活性化セルソーターキャリバ

一で細胞増殖を測定した（図 9 B 参照）。その結果、T L R 4 欠損マウス及びM y D 8 8 欠損マウスの脾臓 B 細胞は、I L - 4 に対する応答においても、野生型マウスの脾臓 B 細胞と同じ挙動を示した。

野生型マウス、M y D 8 8 欠損マウス又はT L R 4 欠損マウスのそれぞれ
5 ぞれの腹腔内に、5 0 0 0 U の I F N - γ （G e n z y m e 社製）又は P B S を投与し、投与から 3 日後に腹膜マクロファージを採取し、F I T C 標識抗マウス I - A^b 抗体でマクロファージの膜面に存在する I - A^b 分子と結合させて細胞を染色し、セルクエストのソフトウェアにより
10 蛍光活性化セルソーターキャリバーで分析した（図 9 C 参照）。この結果から、野生型マウス、T L R 4 欠損マウス及びM y D 8 8 欠損マウスにおいて、腹膜マクロファージでの I - A^b 分子の発現、すなわち I F N - γ が誘発する細胞増殖の阻害も同程度であった。

5 - 6（貧食作用分析）

野生型マウス、M y D 8 8 欠損マウス及びT L R 4 欠損マウスのマク
15 ロファージに 0 . 0 2 5 % の蛍光ラテックスビーズ（0 . 7 5 μ m）（ポリサイエンス社製）を加え、3 7 °C で 2 時間、C O₂ インキュベーター中で培養した。その後、貧食されなかったビーズを取り除くため、この培養物を P B S で 3 回勢いよく洗浄し、2 0 分間、2 . 5 % のホルムアルデヒドを含む P B S でインキュベートし、培養物をホルムアルデヒド
20 で固定した。これらの固定細胞を、A x i o p h o t o 顕微鏡（C a r l Z e i s s 社製）で視覚化したところ、T L R 4 欠損マウス及びM y D 8 8 欠損マウスの腹膜マクロファージは共に、ラテックス粒子を貧食していることがわかった。したがって、これらの他の刺激による T L R 4 欠損マウス及びM y D 8 8 欠損マウスのマクロファージの貧食能は
25 損なわれていないことがわかった。

5 - 7（ポルフィロモナス・ジンジバリスの L P S に対する応答性）

ポルフィロモナス・ジンジバリスのLPSは、LPS低応答性であるC3H/HeJマウスの細胞の活性化能において、ある程度の反応を示すことから(J. Immunol. 158, 1997, 4430-6)、それぞれのマウスのポルフィロモナス・ジンジバリスのLPSに対する応答性を前記サルモネラ・ミネソタRe-595の場合と同様に調べた。野生型マウスのマクロファージでは、ポルフィロモナス・ジンジバリスのLPSの投与量に依存してTNF- α を誘発していたが、TLR4欠損マウスのマクロファージでは、C3H/HeJマウスのマクロファージと同様に低応答性であり、野生型マウスのマクロファージの3分の1程度のTNF- α 産生能を示したに過ぎなかった。これに対し、MyD88欠損マウスのマクロファージでは、高濃度のLPSで刺激しても、検出しうる程のTNF- α を産生しなかった(図10A参照)。

また、ポルフィロモナス・ジンジバリス381のLPSに対して、TLR4欠損マウスの脾臓B細胞は低レベルの増殖応答を示し、脾臓B細胞のI-A^b分子の発現を増大させていたが、MyD88欠損マウスの脾臓B細胞は増殖応答を示さず、I-A^b分子の発現も確認できなかった(図10B、C参照)。また、ポルフィロモナス・ジンジバリス381のリピドAにおいても同様の結果が得られた。これらのことから、ポルフィロモナス・ジンジバリスのLPSに対する応答において、TLR4欠損マウスは低応答性であり、MyD88欠損マウスは不応答性であることがわかった。また、ポルフィロモナス・ジンジバリスのLPSにより誘発されるシグナル伝達に対し、MyD88は必須であるが、TLR4は部分的に寄与していることがわかった。

5-8 (大腸菌O55:B5のLPSに対する応答性)

25 大腸菌(O55:B5)のLPSに対する応答性についても、前記サルモネラ・ミネソタRe-595の場合と同様に調べた。TLR4欠損

マウス及びM y D 8 8 欠損マウスの腹膜マクロファージでは、野生型マウスのマクロファージと比較して、大腸菌（O 5 5 : B 5）のL P Sに対する応答性を損なっていた（図 1 1 A）。しかし、高濃度のL P Sで刺激した場合、T L R 4 欠損マウスのマクロファージは少量のT N F - α を産生したが、それに対してM y D 8 8 欠損マウスのマクロファージは、高濃度のL P S刺激においてもT N F - α を産生しなかった。

また、これらマウスの脾臓B細胞における増殖応答についても同様な傾向が見受けられた（図 1 1 B 参照）。さらに、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ を超えるL P Sで刺激したT L R 4 欠損マウスの脾臓B細胞は、野生型マウスの脾臓B細胞と同程度のI - A^b分子の発現を示したが、M y D 8 8 欠損マウスの脾臓B細胞は $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ のL P Sでの刺激に対してもI - A^b分子の発現を示さなかった（図 1 1 C 参照）。以上の結果から、ポルフィロモナス・ジンジバリスのL P S刺激の場合と同様に、T L R 4 欠損マウスは大腸菌（O 5 5 : B 5）のL P Sに対して低応答性であるが、M y D 8 8 欠損マウスは不応答性であることがわかった。

5 - 9（ペプチドグリカンに対する応答性）

グラム陽性菌の主要な細胞壁成分であるペプチドグリカン（P G N）がマクロファージを活性化することが報告されている（J. Immunol. 155, 1995, 2620-30、Infect. Immun. 62, 1994, 2715-21）。そこで、スタフィロコッカス・アウレウスのP G N（F l u k a 社製）に対する応答性を前記サルモネラ・ミネソタ R e - 5 9 5 の場合と同様に調べた。P G Nで刺激した場合、T L R 4 欠損マウスの腹膜マクロファージは、投与量に依存して野生型マウスのマクロファージとほぼ同程度のT N F - α を産生したが、M y D 8 8 欠損マウスのマクロファージは、高濃度のP G N刺激に対してもT N F - α を産生しなかった（図 1 2 A 参照）。

スタフィロコッカス・アウレウスのP G Nで刺激した場合、野生型マ

ウスの脾臓B細胞は細胞増殖応答を示し、MyD88欠損マウスにおいては野生型マウスと比べて細胞増殖応答が大きく損なわれていたが、その程度がTLR4欠損マウスの場合は小さかった(図12B参照)。また、
10 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ を超える濃度のPGNで刺激した場合、野生型マウスも
5 TLR4欠損マウスもI-A^b分子発現の増大が観察されたが、MyD88欠損マウスの脾臓B細胞では、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ のPGN刺激の場合でもI-A^b分子の発現の増大は見られなかった(図12C参照)。これらのことより、TLR4欠損マウスは、黄色ブドウ球菌のPGNに対して野生型マウスとほぼ同様の応答を示すが、MyD88欠損マウスは
10 不応答性であることがわかった。

5-10 (リポテイコ酸に対する応答性)

リポテイコ酸(LTA)は、グラム陽性菌の細胞壁成分であって、単球とマクロファージの活性化を誘導する(Infect. Immun. 62, 1994, 2715-21)ことから、ストレプトコッカス・ニューモニアのLTA
15 に対する応答性を前記サルモネラ・ミネソタRe-595の場合と同様に調べた。野生型マウスの腹膜マクロファージは、LTAの投与量に応じてTNF- α の産生を増大していた。これに対して、MyD88欠損マウスのマクロファージでは、高濃度のLTA刺激に対してもTNF- α を産生しなかった。また、TLR4欠損マウスも野生型マウスと比較
20 するとTNF- α の産生が損なわれていたが、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ のLTA刺激ではTNF- α を誘発していた(図13A参照)。

次に、ストレプトコッカス・ニューモニアのLTA刺激に対するこれらマウス脾臓B細胞の細胞増殖反応とI-A^b分子の発現の増大を分析した(図13B参照)。この結果から、野生型マウスの脾臓B細胞は、L
25 TAの投与量に応じてLTAに対する応答を増大させるのに対し、MyD88欠損マウスの脾臓B細胞は、LTAに対する増殖反応を非常に損

なっていた。TLR 4 欠損マウスの脾臓 B 細胞においても増殖反応は損なわれていたが、高濃度の LTA で刺激した場合には増殖応答性を示した。また、野生型マウス及び TLR 4 欠損マウスの脾臓 B 細胞では細胞表面において I - A^b 分子の発現が増大するのに対し、MyD 8 8 欠損マウスの脾臓 B 細胞では増大がみられなかった (図 1 3 C 参照)。これらのことから、MyD 8 8 欠損マウスはストレプトコッカス・ニューモニアの LTA 刺激に対して不応答性であることがわかる。

5 - 1 1 (結核菌全細胞溶解物に対する応答性)

結核菌細胞壁成分、特にリポアラビノマンナンは、骨髓性細胞の活性化を誘導することで知られていることから (J. Immunol. 149, 1992, 541-7, J. Clin. Invest. 91, 1993, 2076-83)、結核菌全細胞溶解物に対する応答性を前記サルモネラ・ミネソタ Re - 5 9 5 の場合と同様に調べた。野生型マウスのマクロファージは、全細胞溶解物の投与量に依存して TNF - α を産生していた。また、TLR 4 欠損マウスのマクロファージも、野生型マウスのものと比較するとわずかであるが TNF - α を産生していた。しかし、MyD 8 8 欠損マウスのマクロファージは、高濃度の全細胞溶解物に対しても TNF - α を産生しなかった (図 1 4 A 参照)。

次に、結核菌全細胞溶解物による刺激に対するこれらマウスの応答性について調べた。野生型マウスの脾臓 B 細胞は、全細胞溶解物の投与量に依存して増大する細胞増殖応答と細胞表面での I - A^b 分子の発現を示し、TLR 4 欠損マウスの脾臓 B 細胞でもまた、野生型マウスのものより低いものの細胞増殖応答と I - A^b 分子の発現を示した。これに対して、MyD 8 8 欠損マウスの脾臓 B 細胞では、増殖反応と I - A^b 分子の発現の増大が大きく損なわれており、全細胞溶解物に対して不応答性であることがわかった (図 1 4 B、C 参照)。

5 - 1 2 (他の菌体細胞壁成分に対する応答性)

野生型マウス、T L R 4 欠損マウス及びM y D 8 8 欠損マウスの応答性について、他の菌体細胞壁成分〔クレブシェラ・ニューモニエ、シェードモナス・アウリギノサ 1 0、サルモネラ・チフィウム、フレクスナー赤痢菌、ビブリオ・コレラ等のL P S、及び大日本製薬株式会社のカワタシゲオ氏から提供されたスタフィロコッカス・エピデルミディス (Staphylococcus epidermidis) のP G N〕に対する応答性についても上記と同様に調べた。結果を表 1 に示す。この表 1 から、全ての菌体の成分において、M y D 8 8 欠損マウスが不応答性であることがわかった。

表 1

試料	マウス応答性		
	野生型	TLR4-/-	MyD88-/-
LPS			
<i>Escherichia coli</i> O55:B5	++	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	++	-	-
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	++	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	++	+	-
<i>Salmonella minnesota</i> Re595	++	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	++	+	-
<i>Serratia marcescens</i>	++	+	-
<i>Shigella flexneri</i>	++	+	-
<i>Vibrio cholerae</i>	++	+	-
PGN			
<i>Staphylococcus aureus</i>	++	++	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	++	+	-
LTA			
<i>Streptococcus faecalis</i>	++	+	-
結核菌全細胞溶解物			
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	++	+	-

またLPSは、TLR4を独自のシグナル受容体として利用し、不応答性を示すもの（サルモネラ・ミネソタRe595やクレブシエラ・ニューモニエ等のLPS）や、TLR4欠損マウスに対して低いが応答性を示すもの（ポルフィロモナス・ジンジバリス、エシェリキア・コリO55:B5、シュードモナス・アウリギノサ、フレクスナー赤痢菌、サルモネラ・チフィムリウム、ビブリオ・コレラ等のLPS）の2つの型に分類できることがわかった。後者のLPSに対してMyD88欠損マウスは応答性を示さないことから、これらのLPSの認識とシグナル伝達は、TLR4と他のTLRとの両方により、及び／又はMyD88を

アダプター分子として使用する T L R 関連受容体により介されるものと考えられる。

実施例 6 (T L R 2 ノックアウトマウスの作製)

- 1 2 9 / S v J マウス遺伝子ライブラリー (ストラタジーン社製) から、ヒト T L R 2 遺伝子と類似したマウス E S T クローン (登録番号 D 7 7 6 7 7) 由来のプロープを用いて、T L R 2 遺伝子をスクリーニングし、pBluescript ベクター (ストラタジーン社製) 中でサブクローンし、制限酵素マッピング及び D N A 配列決定により特定した。ターゲッティングベクターは、T L R 2 遺伝子の細胞内領域を含むエクソン部位
- 10 1 . 3 k b の遺伝子フラグメントを、ポリ A シグナルをもつ pMC1-neo (ストラタジーン社製) に置換することにより構築した。かかるターゲッティングベクターは、4 . 8 k b の 5 ' 遺伝子フラグメントと 1 . 0 k b の 3 ' 遺伝子フラグメントとをフランキング配列として有し、H S V - t k カセットを 5 ' 末端に含んでいる。このターゲッティングベクターを S a l I により線状化し、胎生 1 4 . 1 日目の胚幹細胞 (E S 細胞) にエレクトポレーションし、G 4 1 8 及びガンシクロピアに抵抗性を示す 1 2 0 個のクローンを、P C R による相同組換えのためにスクリーニングし、図 1 5 A に示すプロープを用いるサザンブロット分析により 9 個を確かめた。
- 20 相同組み換え変異 T L R 2 対立遺伝子を含有していた 3 個の標的 E S クローンを、C 5 7 B L / 6 マウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションしキメラマウスを作製した。この雄のキメラマウスと C 5 7 B L / 6 雌マウスとを交配させてヘテロ接合体マウスを作製し、かかるヘテロ接合体マウスをインタークロスすることによってホモ接合体マウスを得た (図 1 5 B) 。なお、本発明の T L R 2 欠損マウスはメンデルの法則に従い作製することができ、2 0 週目までは顕著な異常を示さなかった。
- 25

相同組み換え変異により T L R 2 遺伝子の不活性化が生起していることを確認するため、野生型マウス (+/+) 及び T L R 2 ノックアウトマウス (-/-) の腹腔マクロファージ (5×10^6) から抽出した全 R N A ($15 \mu g$) を電気泳動にかけナイロン膜に移して、文献
5 (Immunity 9, 143-150, 1998) 記載の方法と同様に、 $[^{32}P]$ で標識した T L R 2 に特異的な c D N A 又は G A P D H (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) に特異的な c D N A を用いてノーザンブロット分析を行った。これらの結果から、T L R 2 m R N A は T L R 2 欠損マウスの腹腔マクロファージからは検出されなかった (図 1 5 C)。また、
10 T L R 2 ノックアウトマウスの胸腺細胞及び脾臓細胞中の C D 3、B 2 2 0、C D 4 及び C D 8 の発現は、野生型マウスのものと比較しても差異がなかった (図は示さず)。

実施例 7 (T L R 2 ノックアウトマウスのエンドトキシン応答性)

本発明の T L R 2 ノックアウトマウス (5 匹)、T L R 4 ノックアウト
15 マウス (5 匹) 及び野生型マウス (5 匹) に、それぞれ大腸菌 (O 5 5 : B 5) 由来の L P S を $1 m g$ 投与し、その生存率により L P S 不応答性を調べた。結果を図 1 6 に示す。図 1 6 より、本発明の T L R 2 ノックアウトマウス (T L R 2 -/-) 及び野生型マウスは L P S に応答し、
投与後 4 日でほとんどが死亡したのに対して、T L R 4 ノックアウトマ
20 ウス (T L R 4 -/-) は、L P S 投与後 6 日目においても死亡するものではなく、エンドトキシン不応答性であることを確認することができた。

実施例 8 (T L R 2 ノックアウトマウスのグラム陰性菌の菌体成分に対する応答性)

T L R 2 ノックアウトマウス (T L R 2 -/-)、T L R 4 ノックアウト
25 トマウス (T L R 4 -/-) 及び野生型マウス (野生型) のそれぞれの腹腔内に 4 % のチオグリコール酸培地 (D I F C O 社製) を $2 m l$ ずつ

注入し、3日後に各マウスの腹腔内から腹膜滲出細胞を単離し、これらの細胞を10%のウシ胎仔血清（GIBCO社製）を添加したRPMI 1640培地（GIBCO社製）中で37℃にて2時間培養し、氷温のハンクス緩衝液（Hank's buffered salt solution: HBSS; GIBCO社製）で洗浄することにより非付着細胞を取り除き、付着細胞を腹膜マクロファージとして以下の実験に使用した。

得られた各腹膜マクロファージを $\text{INF}\gamma$ （30 unit/ml）の存在下又は非存在下において、1.0 ng/mlの大腸菌由来の合成リピドA（506化合物；第一化学薬品社製）又はサルモネラ・ミネソタ Re-595由来のLPS（シグマ社製）といっしょに24時間培養した。なお、かかる合成リピドAとしては、0.025%のトリエチルアミンを含有し、エンドトキシンを全く含有しない水に可溶化したものを用いた。培養後、培養上清中のIL-6（図17A）、 $\text{TNF}-\alpha$ （図17B）、 NO_2^- （図17C）の産生量を測定した。なお、IL-6は固相酵素免疫検定法（ELISA；ENDOGEN社製）により、 $\text{TNF}-\alpha$ は製造者（Genzyme社製）の指示に基づきELISAにより、 NO_2^- は NO_2/NO_3 アッセイキット（同仁科学研究所社製）を使用したGreiss法により測定した。

上記の結果から、野生型マウス及びTLR2ノックアウトマウスのマクロファージでは、LPSやリピドAに対して同様な応答を示し、IL-6と $\text{TNF}-\alpha$ を産生していた。また、LPSやリピドAに $\text{INF}\gamma$ を加え培養することにより、さらなる $\text{TNF}-\alpha$ 産生の増大が確認できた。一方、TLR4ノックアウトマウスのマクロファージにおいては、IL-6と $\text{TNF}-\alpha$ を産生しなかった。また、野生型マウス又はTLR2ノックアウトマウスから得られたマクロファージを $\text{INF}\gamma$ の添加したりリピドA又はLPSにおいて培養することにより、 NO_2^- の産生

が確認できた。また、リピドAやLPSの投与量を $1\mu\text{g}/\text{ml}$ とした場合も前記と同様の結果が得られた（図は示さず）。

次に、図17Dに示す各種濃度のサルモネラ・ミネソタRe-595由来のLPSの存在下で、野生型マウス、TLR2ノックアウトマウス及びTLR4ノックアウトマウスの各腹腔マクロファージを培養してTNF- α の産生を測定した。この結果から、野生型マウス及びTLR2ノックアウトマウスのマクロファージは、LPSの投与量に応じて同様な増加傾向を示すのに対し、TLR4ノックアウトマウスのマクロファージは、いかなる濃度でもTNF- α を産生しなかった。

10 実施例9（サルモネラ・ミネソタRe-595のLPSに対する応答性）

サルモネラ・ミネソタRe-595のLPSに対する各種マウス（野生型、TLR2-/-、TLR4-/-）の脾臓細胞の応答性について調べた。それぞれのマウスの脾臓細胞（ 1×10^5 ）を単離し、図18Aに示す各種濃度のLPSにより96ウェルプレート内で培養して刺激した。培養から40時間後に $1\mu\text{Ci}$ の $[^3\text{H}]$ -チミジン（デュポン社製）を添加して更に8時間培養し、 $[^3\text{H}]$ の摂取量を β シンチレーションカウンター（パッカー社製）で測定した（図18A）。この結果から、野生型マウス及びTLR2ノックアウトマウスの脾臓細胞では、LPSの投与量に依存して同様に細胞増殖反応を促進していたが、TLR4欠損マウスの脾臓細胞では、いかなる濃度のLPS刺激においてもLPSによる細胞増殖反応は見られなかった。

また、フローサイトメトリーにより、Re-595のLPSに対する応答におけるB細胞表面の主要組織適合遺伝子複合体（MHC）クラスII（I-A^b）の発現について調べてみた。野生型マウス、TLR2ノックアウトマウス（2-/-）、TLR4ノックアウトマウス（4-/-）のそれぞれの脾臓B細胞（ 1×10^5 ）を単離し、種々の濃度（0、1

0¹、10²、10³、10⁴又は10⁵ ng/ml)のLPS又は100 U/mlのIL-4を用いて、96ウェルプレート内で48時間培養した。培養後細胞を採取して、フィコエリトリン (phycoerythrin: PE; ファーミンジェン社製) で標識した抗B220抗体、又は

5 はビオチン化抗マウスI-A^b抗体 (ファーミンジェン社製) に、フルオレセインイソシアネート (FITC; ファーミンジェン社製) で標識したストレプトアビジンを結合させたFITC標識化抗体により、それらの細胞表面におけるI-A^b分子に結合させて細胞を染色した。染色した細胞をセルクエストソフトウェア (ベクトンディッキンソン社製)

10 により蛍光活性化セルソーターキャリバー (FACS Calibur) で分析した (図18B)。この結果から、Re-595のLPSは、野生型マウス及びTLR2ノックアウトマウスの脾臓B細胞表面でのI-A^b分子の発現を増大しているのに対し、TLR4欠損マウスの脾臓B細胞では、高濃度のLPS (10⁵ ng/ml) で刺激しても、I-A^b分子の発現は

15 増大しなかった。以上のことから、TLR2ノックアウトマウスは、野生型マウス同様LPSに対して応答性を示すことがわかった。また、IL-4で刺激した場合には、脾臓B細胞表面でのI-A^b分子の発現はどのノックアウトマウスにおいても正常であった。

実施例10 (TLR2ノックアウトマウスのマクロファージのグラム陽

20 性菌由来の細胞壁成分不応答性)

上記野生型マウス (野生型)、TLR2ノックアウトマウス (TLR2-/-)、TLR4ノックアウトマウス (TLR4-/-) 等のそれぞれの腹膜マクロファージのグラム陽性菌由来の細胞壁成分に対する応答性を、スタフィロコッカス・アウレウス (*S. aureus*)、コリネバクテリウム・ジフテリア (*C. diphtheriae*) 及びノカルジア・コエリアカ (*N. coeliaca*) の細胞壁調製物を用いて調べた。細胞調製物は、文献 (Biken

25

J. 18, 77-92, 1975、Infect. Immun. 38, 817-824, 1982) 記載の方法と同様に、適切な培養条件下で培養した細胞菌体を、ブラウン・メカニカル・セル・ホモジナイザー (MSKモデル; B. Braun Apparatebau 社製) 又は Dyno-Mill (タイプ KDL; Willy A, Biohofen Manufacturing Engineers 社製) のいずれかで破壊した。破壊した細胞懸濁液の分画遠心法により得た粗細胞壁画分をプロテアーゼで処理し、細胞壁に元々存在していない成分を除去することにより精製調製した。

それぞれのマウスの腹膜マクロファージを、種々の濃度 (0, 0.1, 1, 10 又は 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の上記調製物の存在下で 24 時間培養して刺激し、それぞれのマクロファージから放出される腫瘍壊死因子 (TNF- α) の濃度を ELISA により測定した (図 19)。これらの結果から、TLR2 ノックアウトマウスのマクロファージは、野生型マウス及び TLR4 ノックアウトマウスのものより、グラム陽性菌由来の細胞壁成分に対する応答における TNF- α の産生が損なわれることがわかった。

実施例 11 (TLR2 ノックアウトマウスのグラム陽性菌の細胞壁成分に対する応答性)

次に、グラム陽性菌のどの細胞壁成分が TLR2 を介してマクロファージを活性化するかを調べてみた。従来、グラム陽性菌の細胞壁成分であるペプチドグリカン (PGN) 及びリポテイコ酸 (LTA) が単球/マクロファージを活性化するとの報告がある (Infect. Immun. 60, 3664-3672, 1992、Immunity 1, 509-516, 1994、J. Biol. Chem. 271, 23310-23316, 1996、Infect. Immun. 64, 1906-1912, 1996) ことから、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のスタフィロコッカス・アウレウスの PGN (Fluka 社製; 図 20A) 又は 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のスタフィロコッカス・アウレウスの LTA (シグマ社製; 図 20C) を用いて、実施例 8 と同様の方

法により、各種マウスの腹膜マクロファージに対する応答での I L - 6 及び NO_2^- の産生量を測定した。また、実施例 10 と同様に、各種マウスの腹膜マクロファージの P G N (図 20 B) 又は L T A (図 20 D) に対する応答での T N F - α の産生を測定した。

- 5 図 20 A の結果から、野生型マウス及び T L R 4 ノックアウトマウスの腹膜マクロファージでは、P G N に対する応答により I L - 6 を産生するのに対し、T L R 2 ノックアウトマウスのものでは産生しないことがわかった。また、野生型マウス及び T L R 4 ノックアウトマウスの腹膜マクロファージを I F N - γ の存在下で P G N といっしょに培養する
10 と NO_2^- を産生するのに対して、T L R 2 ノックアウトマウスのものでは産生しないことがわかった。一方、野生型マウス及び T L R 2 ノックアウトマウスの腹膜マクロファージでは、L T A に対する応答により I L - 6 を産生するのに対し、T L R 4 ノックアウトマウスのものでは産生しないことがわかった (図 20 C)。また、野生型マウス及び T L R 2
15 ノックアウトマウスの腹膜マクロファージを I F N - γ の存在下で L T A といっしょに培養すると NO_2^- を産生するのに対して、T L R 4 ノックアウトマウスのものでは産生しないことがわかった (図 20 C)。

- 図 20 B に示されているように、T L R 4 ノックアウトマウスの腹膜マクロファージは、野生型マウスのものと同様に、P G N の投与量に応じて T N F - α の産生を増加させるのに対して、T L R 2 ノックアウト
20 マウスのものでは、T N F - α 産生が実質的に損なわれており、P G N 不応答性であることがわかった。一方、図 20 D に示されているように、T L R 2 ノックアウトマウスの腹膜マクロファージは野生型マウスのものと同様に、L T A の投与量に応じて T N F - α の産生を誘導するの
25 対し、T L R 4 ノックアウトマウスのものでは、T N F - α 産生がなく、L T A 不応答性であることがわかった。以上のことから、グラム陽性菌

の細胞壁成分である P G N が T L R 2 を介してマクロファージを活性することや、L T A が T L R 4 を介してマクロファージを活性することがわかった。

実施例 1 2 (L P S 又は P G N 刺激によるインビトロでのキナーゼアッセイ及びウェスタンブロット)

T L R ファミリーメンバーは、アダプタータンパク質 M y D 8 8 を介してセリン／トレオニンキナーゼである I R A K を活性化し、次いで r e l 型転写因子である N F - κ B を活性化する、細胞内シグナル伝達分子として知られている (Mol. Cell 2, 253-258, 1998, J. Exp. Med. 187, 2097-2101, 1998, Immunity 11, 115-122, 1999)。L P S 及び P G N が、かかる細胞内シグナル伝達分子を活性化するかどうかを次のようにして調べた。各種マウスの腹腔マクロファージ (1×10^6) を、 $1 \text{ ng} / \text{ml}$ のサルモネラ・ミネソタ R e - 5 9 5 の L P S 又は $10 \mu \text{g} / \text{ml}$ のスタフィロコッカス・アウレウスの P G N で図 2 1 に示された時間刺激し、これらの細胞菌体を、溶解緩衝液 (最終濃度で 1.0 % のトリトン X - 100、137 mM の N a C l、20 mM のトリス - H C l、5 mM の E D T A、10 % のグリセロール、1 mM の P M S F、 $20 \mu \text{g} / \text{ml}$ のアプロチニン、 $20 \mu \text{g} / \text{ml}$ のロイペプチン、1 mM の N a ₃ V O ₄ 及び 10 mM の β - グリセロリン酸を含有する緩衝液: p H 8.0) 中にて溶解し、抗 I R A K 抗体 (林原生化学研究所株式会社) で免疫沈降して、文献 (Biochem. Biophys. Res. Commun. 234, 183-196, 1998, Immunity 11, 115-122, 1999) 記載のように、インビトロキナーゼアッセイを行い、I R A K の自己リン酸化を測定した (図 2 1 A, B における A u t o)。

また、上記溶解物を、S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離させ、ニトロセルロース膜に移し、この膜を抗 I R A K 抗体

(Transduction Laboratories 社製) でブロットして、エンハンスド・ケミルミネッセンス装置 (デュポント社製) を使用して視覚化した (図 2 1 A, B における WB)。以上の結果から、L P S に対する応答での I R A K 活性化は、野生型マウス (野生型) 及び T L R 2 ノックアウトマウス (T L R 2 - / -) において観察できたが、T L R 4 ノックアウトマウス (T L R 4 - / -) では観察できなかった。一方、P G N に対する応答での I R A K 活性化は、野生型マウス及び T L R 4 ノックアウトマウスのみにおいて確認することができた。これらのことから、L P S は T L R 4 を、P G N は T L R 2 をそれぞれ介し認識されることがわかった。

さらに、L P S 又は P G N に対する応答による N F - κ B の活性化についても調べてみた。上記 L P S 又は P G N で刺激した各種マウスのマクロファージから核抽出物を精製し、N F - κ B の D N A 結合部位に対する特異的プローブといっしょにインキュベートし、文献 (Immunity 9, 143-150, 1998) 記載の電気泳動移動度シフト分析により視覚化した。その結果を図 2 1 C, D に示す。なお、図中の矢印は N F - κ B と特異的プローブとの複合物の位置を示し、矢頭は特異的プローブのみの位置を示している。これらの結果から、L P S に対する応答による N F - κ B の D N A 結合活性を、野生型マウス及び T L R 2 ノックアウトマウスのマクロファージの核抽出物において検出できたが、T L R 4 ノックアウトマウスのものではかかる活性を検出できなかった。一方、P G N に対する応答による N F - κ B 活性化は、野生型マウスと T L R 4 ノックアウトマウスのマクロファージで確認できたが、T L R 2 ノックアウトマウスのものでは確認できなかった。これらのことから、T L R 4 は L P S 誘導 N F - κ B 活性化に、T L R 2 は P G N 誘導 N F - κ B 活性化に不可欠であることがわかった。

実施例 1 3 (R-MALP-2 と S-MALP-2 の立体特異的リポペプチド合成及びHPLC精製)

出発原料として、各々 99% 以上の純粋なエナンチオマーを含有する (S) - (-) - グリシドール及び (R) - (+) - グリシドール (シグマーアルドリッチ社製) の 2 つの試薬を用いて文献 (Int. J. Peptide Protein. Res. 38, 545, 1991) 記載の方法により、S - (2, 3 - ジヒドロオキシプロピル) - L - システインの立体異性体を合成した。これら立体異性体から N_α - フルオレニルメトキシカルボニル基で保護された S - [2 (S), 3 - ビス (パルミトイルオキシ) プロピル] - L - システインと S - [2 (R), 3 - ビス (パルミトイルオキシ) プロピル] - L - システインとの異性体をそれぞれ合成し、上記文献記載の方法でカップリングし、担体に結合したフルオレニルメトキシカルボニル基で保護されたペプチドを得た。10 mg の粗精製 MALP-2 を、SP 250/10 Nucleosil 300-7 C8 column (Macherey & Nagel 社製) を用いて逆相 HPLC によりバッチ処理してさらに精製し、0.1% のトリフルオロ酢酸を含んだ水 / 2 - プロパノールの直線的グラジエントにより 40℃ で溶出し、活性溶出画分を NO 解離分析によりモニターし、最終生成物は質量分析、及び、正確なペプチド含量を決定するためのアミノ酸分析により特徴づけられた。これら MALP-2 を水 / 2 - プロパノール 1 : 1 (容積比) の溶液を用い 1 mg / ml の濃度に調整し、4℃ で保存した。

実施例 1 4 (CH3 / HeJ マウスの腹腔マクロファージのリポタンパク / リポペプチドに対する応答性)

CH3 / HeJ 由来のエンドトキシン低応答性マウスから PEC (腹腔滲出細胞) を単離し、これら PEC (6×10^5) を 5% の FCS と 25 μ M の 2 - メルカプトエタノールを含んだダルベッコ MEM 培地

- (DMEM) 1. 25 ml の入った 24 穴細胞培養プレート中で 37℃ にて一晩培養した。この培養物から非付着細胞を取り除き、新しい培養液に交換して腹膜マクロファージを調製した。各種濃度 (0. 1、1、10、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 又は 10^6 pg/ml) の実施例 8
- 5 の方法により得られた R-MALP-2 又は S-MALP-2 と、濃度 30 unit/ml の組換えインターフェロナー γ (rIFN- γ) の共存下に、上記腹膜マクロファージを培養し、培養上清中の NO_2^- 、TNF- α 及び IL-6 の産生量を測定した (図 22)。TNF- α は培養から 3 時間後に ELISA (Genzyme 社製) によって、IL-6
- 10 は培養から 21 時間後に ELISA (ENDOGEN 社製) によって、 NO_2^- は培養から 46 時間後に $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ アッセイキット (同仁科学研究所社製) を使用した Greiss 法によってそれぞれ測定した。これらの結果から、S-MALP-2 より R-MALP-2 の方が、腹膜マクロファージに対してより高い特異活性を示すことがわかった。
- 15 実施例 15 (ヒト単球のリポタンパク/リポペプチドに対する応答性)
- 健康なヒトから得られた単球を洗浄後、実験に用いた。実施例 13 の方法により得られた R-MALP-2 又は S-MALP-2 の各種濃度 (0. 1、1、10、 10^2 、 10^3 、 10^4 又は 10^5 pg/ml) 下、ヒト単球 (7.5×10^5) を 20 時間刺激した。刺激後、IL-8、
- 20 MCP-1 及び TNF- α の産生量を ELISA により測定した (図 23)。この結果から、実施例 14 のマウス由来のマクロファージの場合と同様に、S-MALP-2 より R-MALP-2 の方がマクロファージ等に分化する前のヒト単球に対してより高い特異活性を示すことがわかった。
- 25 実施例 16 (TLR2 ノックアウトマウスのリポタンパク/リポペプチド不応答性)

野生型マウス（野生型）、TLR2ノックアウトマウス（TLR2^{-/-}）、TLR4ノックアウトマウス（TLR4^{-/-}）、MyD88ノックアウトマウス（MyD88^{-/-}）のそれぞれの腹膜マクロファージのリポタンパク／リポペプチドに対する応答性を、マイコプラズマ由来のMALP-2を用いて調べた。それぞれのマウスの腹膜マクロファージを実施例14と同様の方法により単離し、各腹膜マクロファージをrINF γ （30 unit/ml）の存在下（図24B及びD）又は非存在下（図24A及びC）において、実施例13より得られた各種濃度（0、0.1、1、10、10²、10³又は10⁴ pg/ml）のR-MALP-2又はS-MALP-2といっしょに24時間培養した。培養後、培養上清中のTNF- α 及びNO₂⁻の産生量を測定した（図24）。

上記の結果から、野生型マウス及びTLR4欠損マウスの腹膜マクロファージは、R-MALP-2の投与量に応じてTNF- α やNO₂⁻の産生を増加しているのに対して、TLR2欠損マウス及びMyD88欠損マウスの腹腔マクロファージではTNF- α もNO₂⁻も産生しなかった（図24A及びB）。また、S-MALP-2においても同様の結果が得られた（図24C及びD）。その他、R-MALP-2又はS-MALP-2刺激によるIL-6産生も、TLR2欠損マウス及びMyD88欠損マウスの腹腔マクロファージでは不応答性であることが確認された（図示せず）。以上のことから、R-MALP-2等のマイコプラズマ由来のリポタンパク／リポペプチドがTLR2及びMyD88を介してマクロファージを活性化することがわかった。

実施例17（リポタンパク／リポペプチド刺激によるインビトロでのキナーゼアッセイ及びウェスタンブロット）

実施例16の結果から、リポタンパク／リポペプチドが細胞内シグナル伝達分子を活性化するかどうかを調べるために、上記4種のマウスの

5 腹腔マクロファージ (1×10^6) を、 0.3 ng/ml の R-MALP-2 で 10 分間刺激し、実施例 12 と同様に抗 IRAK 抗体を用いてインビトロキナーゼアッセイ (図 25A の Auto) 及びウエスタンブロット分析 (図 25A の WB) や電気泳動移動度シフト分析 (図 25B) 10 を行った。また、抗 JNK1 抗体を用いたインビトロキナーゼアッセイ (図 25C の Auto) 及びウエスタンブロット分析 (図 25C の WB) を行った。これらの結果から、TLR2 ノックアウトマウス及び MyD88 ノックアウトマウスのマクロファージにおいて、MALP に対する IRAK、NF- κ B 及び JNK の活性化が確認できなかった。以上のことから、マイコプラズマ由来のリポタンパク/リポペプチドは、TLR2 及び MyD88 シグナル伝達経路を介して生体反応を引き起こしていることが明かとなった。

産業上の利用可能性

15 本発明の細菌菌体成分不応答性モデル動物である、MyD88 ノックアウトマウスは、グラム陰性細菌由来のエンドトキシンや、グラム陽性菌由来のペプチドグリカン、リポテイコ酸、結核菌溶解物等のグラム陽性菌の細胞壁成分や、リポタンパク/リポペプチドなどに対して不応答性であり、また、TLR2 ノックアウトマウスは、グラム陽性菌等の細胞壁成分ペプチドグリカンや、リポタンパク/リポペプチド等に対して 20 不応答性であり、グラム陽性菌細胞壁成分に対して低応答性であるため、これらのノックアウトマウスを用いることによって、グラム陽性菌の細胞壁成分であるペプチドグリカンや、リポタンパク/リポペプチド等の選択的成分のシグナル受容体に対して有用な情報や、細菌感染症に対する促進物質又は抑制物質、TLR2 に対するアゴニストやアンタゴニストなどの細菌菌体成分に対する応答性の促進物質又は抑制物質のスクリ 25

- ーニングや、被検物質のエンドトキシン活性、IL-1活性、IL-18活性を評価や、被検物質中の細菌菌体成分の検出が可能となり、ひいては、これらエンドトキシン等の細菌細胞壁成分、IL-1、IL-18又はこれらのレセプターの過剰な産生等に起因する疾病に対する薬剤
- 5 の開発に有用な情報や、マイコプラズマ属やスピロヘータ属等の細菌による感染成立の分子機構の解明及び感染症への新たな治療薬の開発に有用な情報を得ることができる。

請 求 の 範 囲

1. 細菌菌体成分であるリポタンパク／リポペプチドに対して不応答性であることを特徴とする細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物。
- 5 2. リポタンパク／リポペプチドが、マイコプラズマ属に属する細菌に由来するマクロファージ活性化リポペプチドであることを特徴とする請求項1記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物。
3. 細菌菌体成分であるペプチドグリカンに対して不応答性であることを特徴とする請求項1又は2記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物。
- 10 4. グラム陽性菌細胞壁画分に対して低応答性であることを特徴とする請求項1～3のいずれか記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物。
5. 細菌菌体成分であるエンドトキシンに対して不応答性であることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物。
- 15 6. 細菌菌体成分であるリポテイコ酸に対して不応答性であることを特徴とする請求項1～5のいずれか記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物。
7. 細菌菌体成分である結核菌溶解物に対して不応答性であることを特徴とする請求項1～6のいずれか記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物。
- 20 8. 請求項1～4のいずれか記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物が、TLR2遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物であることを特徴とする細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物。
- 25 9. 請求項1～7のいずれか記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物が、MyD88遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物である

ことを特徴とする細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物。

10. 非ヒト動物が、齧歯目動物であることを特徴とする請求項1～9のいずれか記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物。

11. 齧歯目動物が、マウスであることを特徴とする請求項10記載の
5 細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物。

12. 請求項1～11のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞と被検物質とをあらかじめインビトロで接触せしめた後、該マクロファージ又は脾臓細胞を細菌菌体成分の存在下で培養し、該マクロファージ又は脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価すること
10 を特徴とする細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

13. 請求項1～11のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞と細菌菌体成分とをあらかじめインビトロで接触せしめた後、該マクロファージ又は脾臓細胞を被検物質の存在下で培養し、該マクロファージ又は脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価すること
15 を特徴とする細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

14. 請求項1～11のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物にあらかじめ被検物質を投与した後、該非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞を細菌菌体成分の存在下で培養し、該マクロファージ又は脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価すること
20 を特徴とする細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

15. 請求項1～11のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性

である非ヒト動物にあらかじめ被検物質を投与した後、該非ヒト動物を細菌により感染させ、該非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することを特徴とする細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

16. 請求項1～11のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物をあらかじめ細菌により感染させた後、該非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞を被検物質の存在下で培養し、該マクロファージ又は脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することを特徴とする細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

17. 請求項1～11のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物をあらかじめ細菌により感染させた後、該非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することを特徴とする細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

18. 請求項1～11のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物にあらかじめ被検物質を投与した後、該非ヒト動物を細菌により感染させ、該非ヒト動物におけるマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することを特徴とする細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

19. 請求項1～11のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物をあらかじめ細菌により感染させた後、該非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物におけるマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することを特徴とする細菌菌体成分対

する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

20. マクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価するに際し、対照として細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物と同種の野生型非ヒト動物の測定値と比較・評価することを特徴とする請求項 12～19 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

21. マクロファージ活性の程度の測定・評価が、該マクロファージにおけるサイトカイン及び／又は亜硝酸イオンの産生量の測定・評価であることを特徴とする請求項 12～20 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

22. 脾臓細胞活性の程度の測定・評価が、該脾臓細胞における MHC クラス II の発現量の測定・評価であることを特徴とする請求項 12～20 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

23. 細菌菌体成分が、リポタンパク／リポペプチドであることを特徴とする請求項 12～22 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

24. リポタンパク／リポペプチドが、マイコプラズマ属、スピロヘータ属又はエセリシア属に属する細菌の菌体成分由来のリポタンパク／リポペプチドであることを特徴とする請求項 23 記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

25. 細菌菌体成分が、ペプチドグリカンであることを特徴とする請求項 12～22 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

26. 細菌菌体成分が、エンドトキシンであることを特徴とする請求項 12～22 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又

は促進物質のスクリーニング方法。

27. 細菌菌体成分が、リポテイコ酸であることを特徴とする請求項12～22のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

5 28. 細菌菌体成分が、結核菌溶解物であることを特徴とする請求項12～22のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

29. 細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質が、細菌感染症に対する抑制物質又は促進物質であることを特徴とする請求項12
10 ～28のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

30. 細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質が、TLR2に対するアゴニスト又はアンタゴニストであることを特徴とする請求項12～28のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質
15 又は促進物質のスクリーニング方法。

31. 細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質が、インターロイキン-1活性の抑制物質又は促進物質であることを特徴とする請求項12～28のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

20 32. 細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質が、インターロイキン-18活性の抑制物質又は促進物質であることを特徴とする請求項12～28のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

33. 細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質が、IFN- γ 活性の抑制物質又は促進物質であることを特徴とする請求項12～
25 28のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進

物質のスクリーニング方法。

34. 細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質が、TNF- α 活性の抑制物質又は促進物質であることを特徴とする請求項12～28のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

35. 請求項12～34のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法により得られることを特徴とする細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質。

36. 細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質が、細菌感染症に対する抑制物質又は促進物質であることを特徴とする請求項35記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質。

37. 細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質が、TLR2に対するアゴニスト又はアンタゴニストであることを特徴とする請求項35記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質。

38. 請求項1～11のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物に被検物質を投与して、該被検物質の生物活性を評価することを特徴とする被検物質の評価方法。

39. 請求項1～11のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物と、該非ヒト動物の野生型非ヒト動物とにそれぞれ被検物質を投与して、該被検物質の生物活性を比較・評価することを特徴とする被検物質の評価方法。

40. 生物活性がエンドトキシン活性であることを特徴とする請求項38又は39記載の被検物質の評価方法。

41. 生物活性がインターロイキン-1活性であることを特徴とする請求項38又は39記載の被検物質の評価方法。

42. 生物活性がインターロイキン-18活性であることを特徴とする

請求項 3 8 又は 3 9 記載の被検物質の評価方法。

4 3. 請求項 1 ~ 1 1 のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物に被検物質を投与して、該被検物質中の細菌菌体成分を検出することを特徴とする細菌菌体成分の検出方法。

- 5 4 4. 請求項 1 ~ 1 1 のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物と、該非ヒト動物の野生型非ヒト動物とにそれぞれ被検物質を投与して、該被検物質中の細菌菌体成分を検出することを特徴とする細菌菌体成分の検出方法。

- 4 5. 細菌菌体成分が、リポタンパク／リポペプチドであることを特徴とする請求項 4 3 又は 4 4 記載の細菌菌体成分の検出方法。
10

4 6. リポタンパク／リポペプチドが、マイコプラズマ属、スピロヘータ属又はエセリシア属に属する細菌の菌体成分由来のリポタンパク／リポペプチドであることを特徴とする請求項 4 5 記載の細菌菌体成分の検出方法。

- 15 4 7. 細菌菌体成分が、ペプチドグリカンであることを特徴とする請求項 4 3 又は 4 4 記載の細菌菌体成分の検出方法。

4 8. 細菌菌体成分が、エンドトキシンであることを特徴とする請求項 4 3 又は 4 4 記載の細菌菌体成分の検出方法。

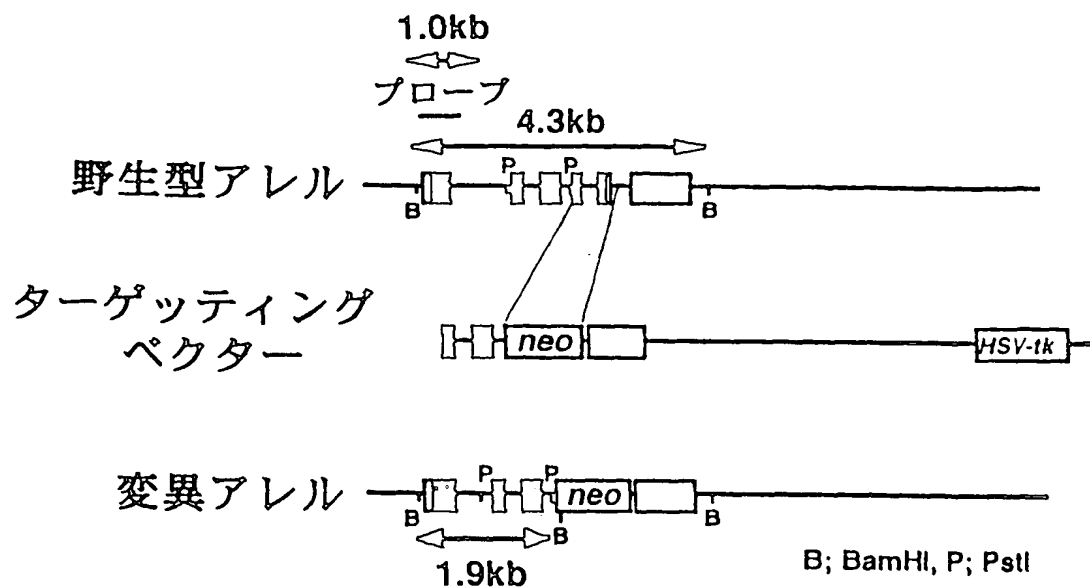
- 4 9. 細菌菌体成分が、リポテイコ酸であることを特徴とする請求項 4
20 3 又は 4 4 記載の細菌菌体成分の検出方法。

- 5 0. マウス遺伝子ライブラリーからマウス E S T クローン由来のプロ
ープを用いてスクリーニングすることにより得られた T L R 2 遺伝子の
細胞内領域を含むエクソン部位の全部又は一部の遺伝子フラグメントを、
ポリ A シグナルとマーカー遺伝子をもつプラスミドに置換してターゲッ
25 ティングベクターを構築し、該ターゲッティングベクターを線状化した
後胚幹細胞に導入し、T L R 2 遺伝子機能を欠損した標的胚幹細胞を、

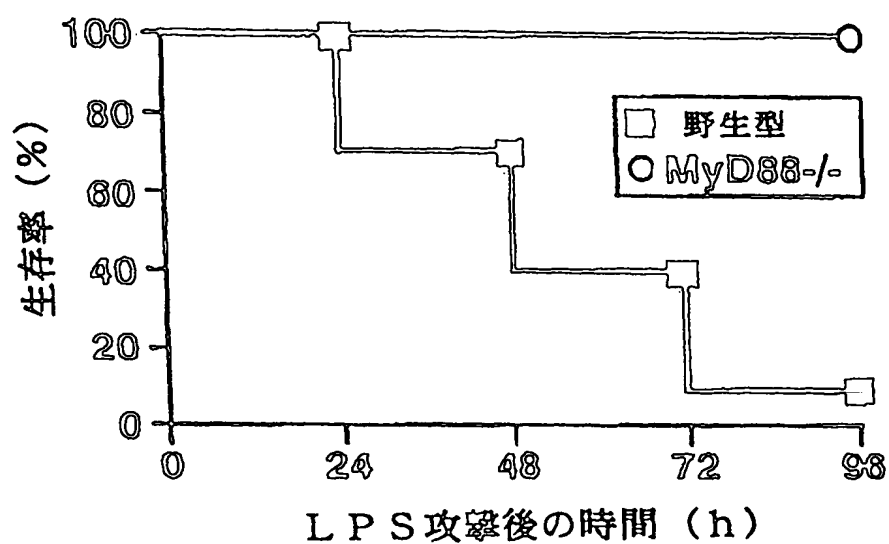
マウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションしキメラマウスを作製し、このキメラマウスと野生型マウスとを交配させてヘテロ接合体マウスを作製し、かかるヘテロ接合体マウスをインタークロスすることによって得られることを特徴とする TLR 2 ノックアウトマウス。

- 5 51. マウス遺伝子ライブラリーからマウス E S T クローン由来のプロープを用いてスクリーニングすることにより得られた M y D 8 8 遺伝子領域の C 末端部分をコードした 2 つのエクソン領域の全部又は一部の遺伝子フラグメントを、ポリ A シグナルとマーカー遺伝子をもつプラスミドに置換してターゲッティングベクターを構築し、該ターゲッティング
- 10 ベクターを線状化した後胚幹細胞に導入し、M y D 8 8 遺伝子機能を欠損した標的胚幹細胞を、マウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションしキメラマウスを作製し、このキメラマウスと野生型マウスとを交配させてヘテロ接合体マウスを作製し、かかるヘテロ接合体マウスをインタークロスすることによって得られることを特徴とする M y D 8 8 ノック
- 15 アウトマウス。

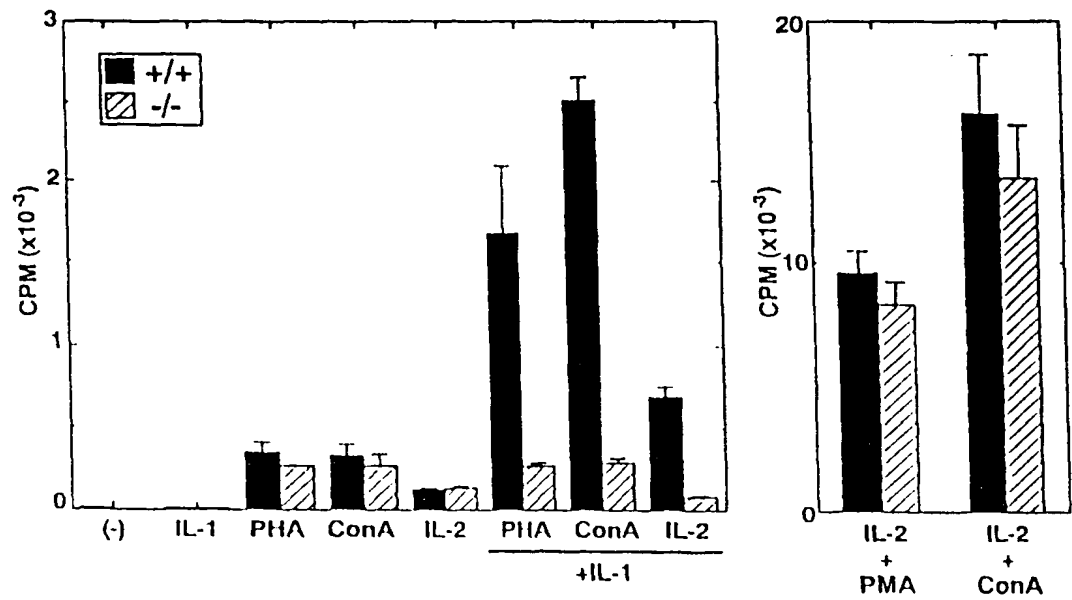
第 1 図



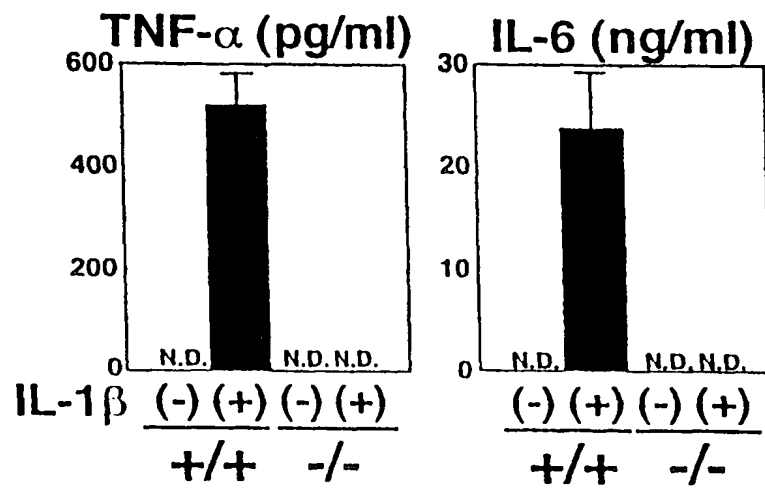
第 2 図



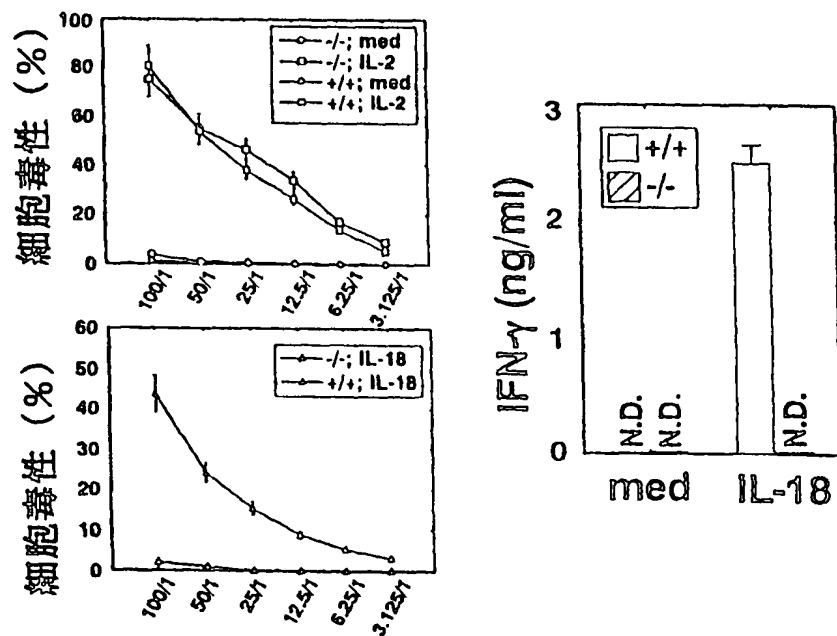
第 3 図



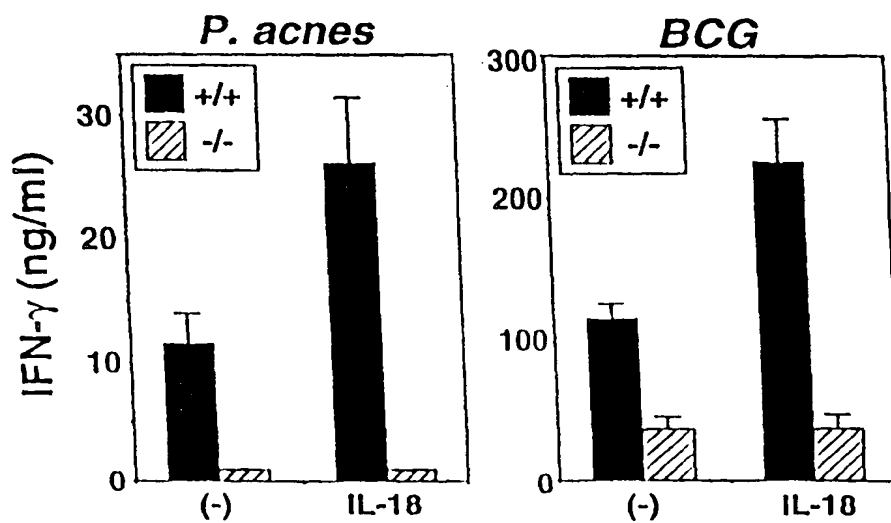
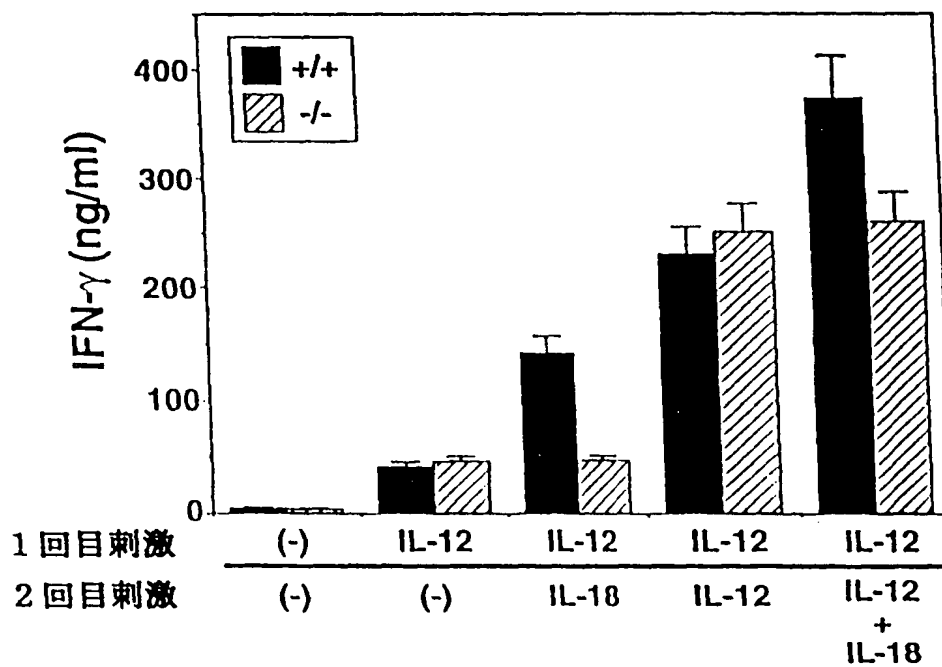
第 4 図



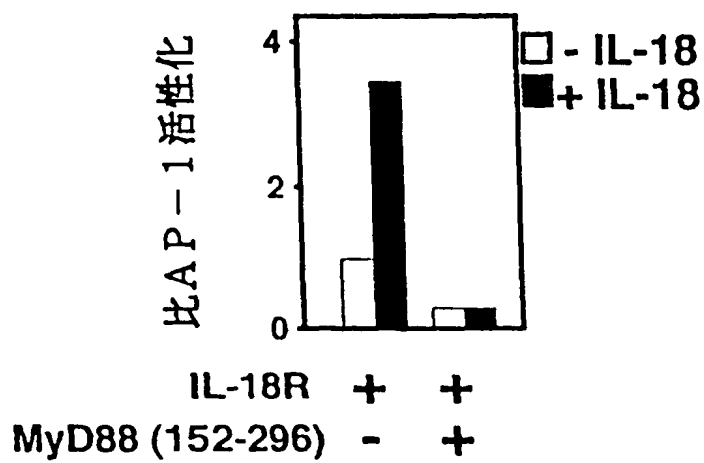
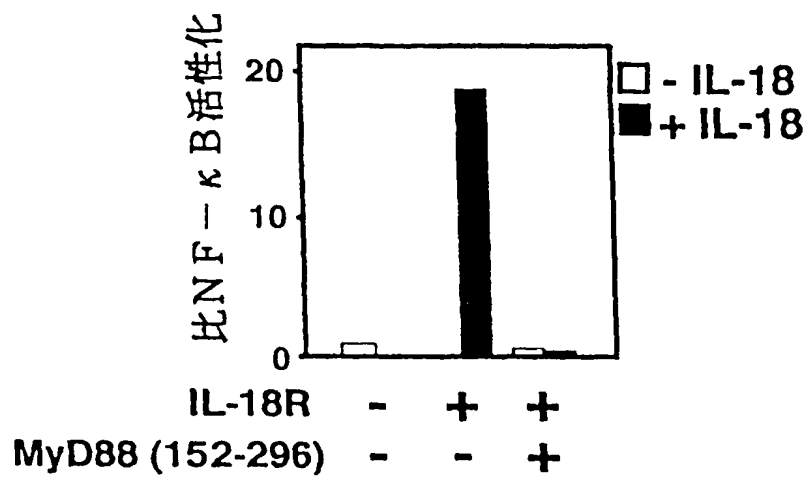
第 5 図



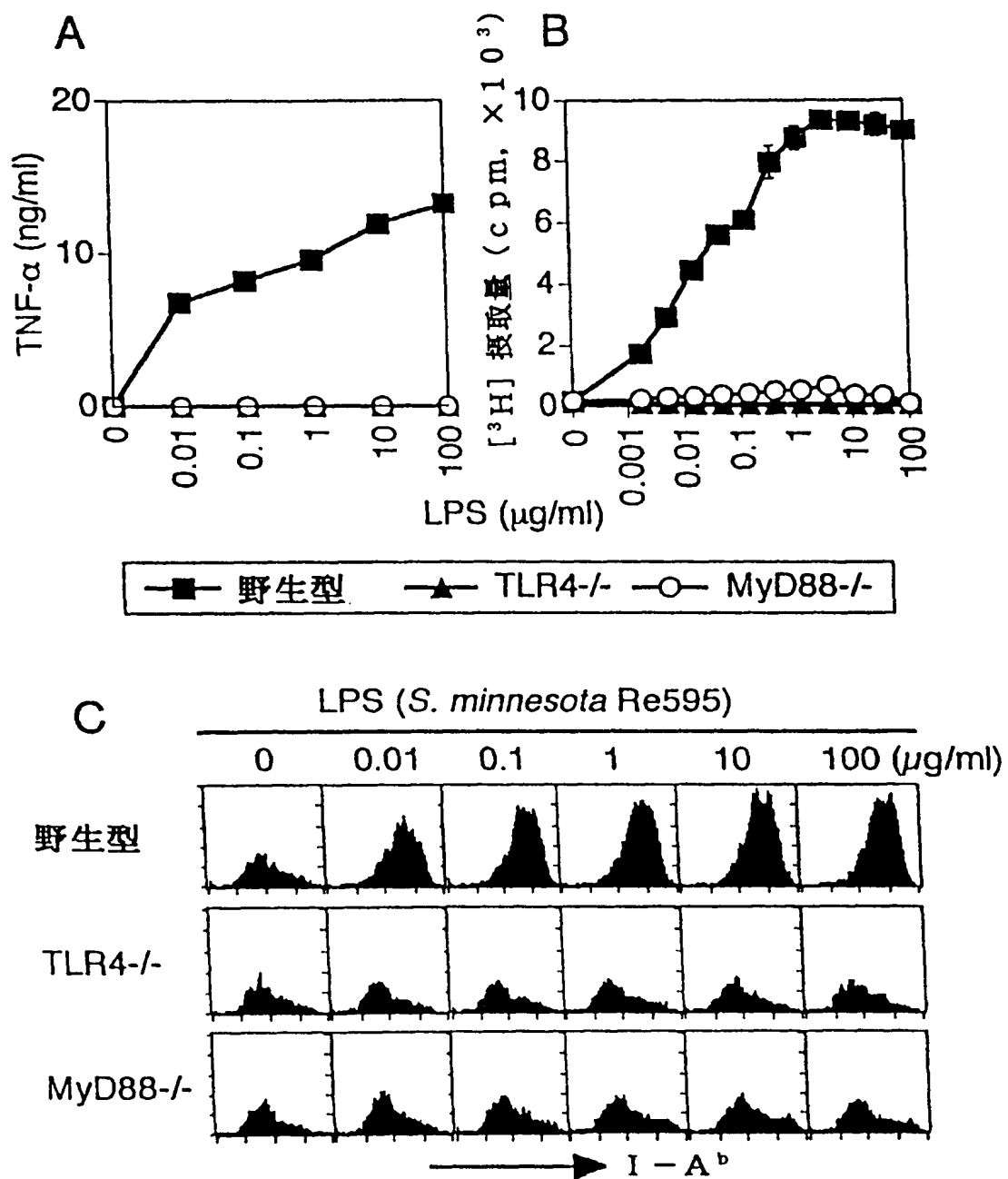
第 6 図



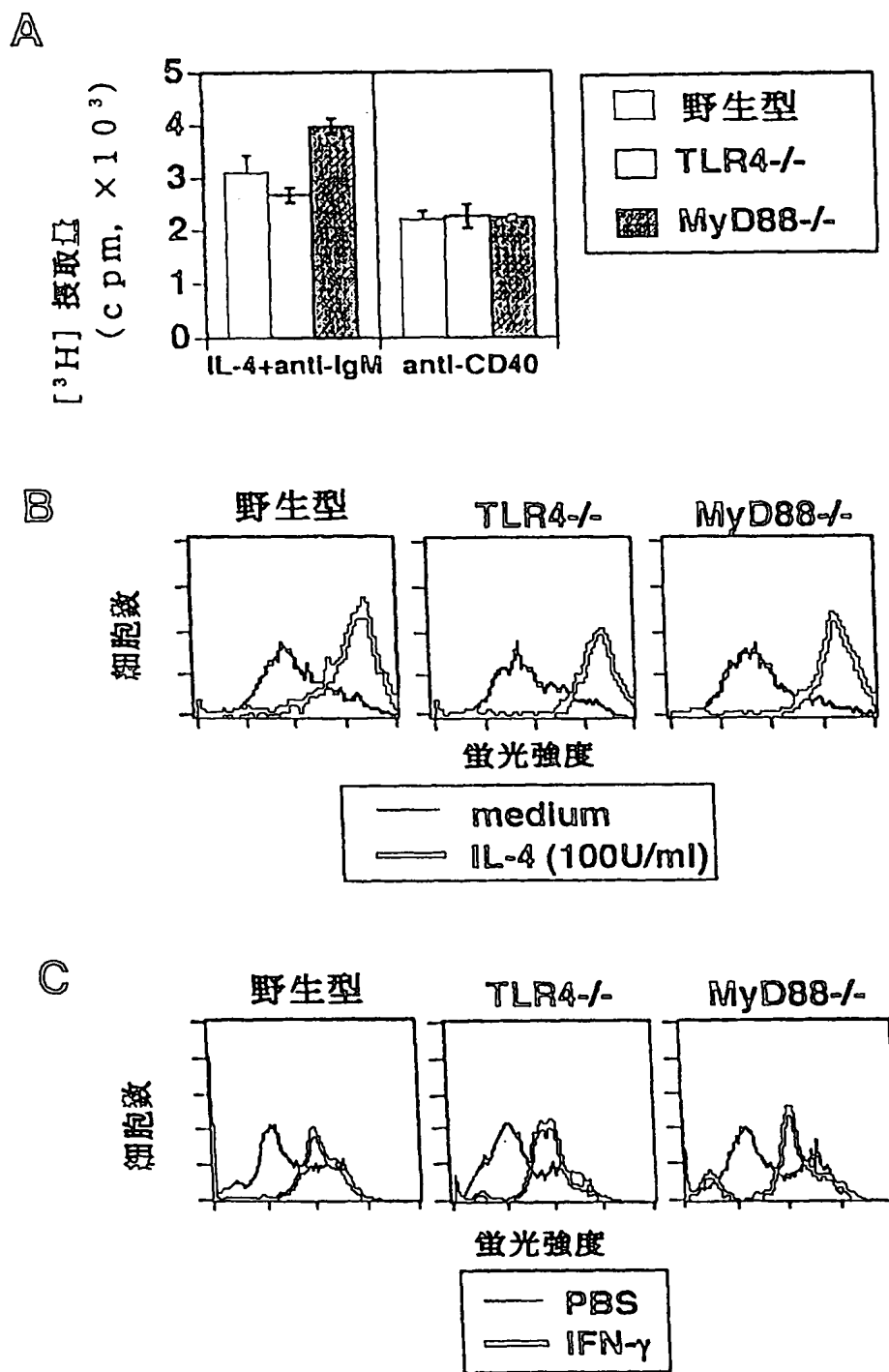
第 7 図



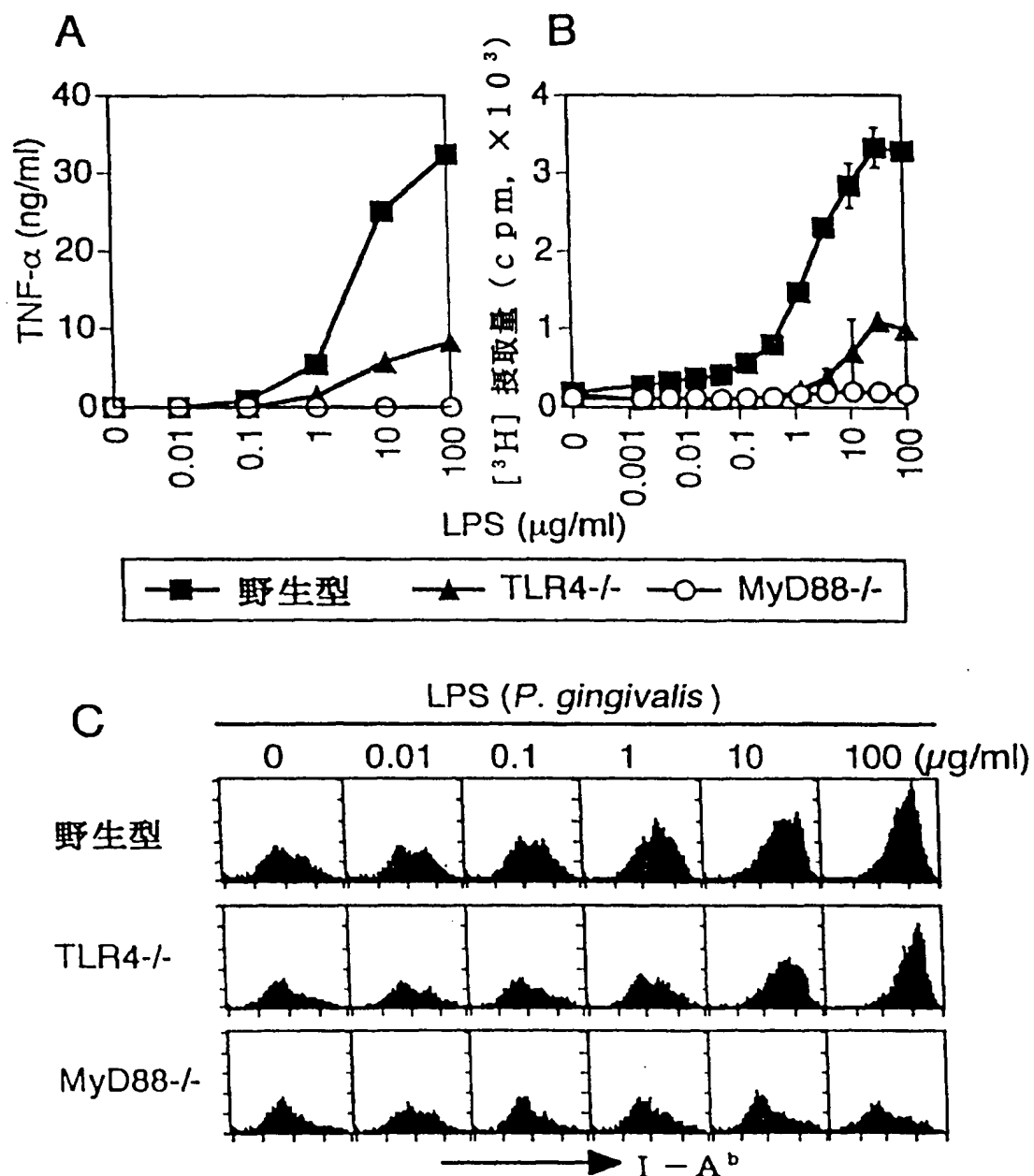
第 8 図



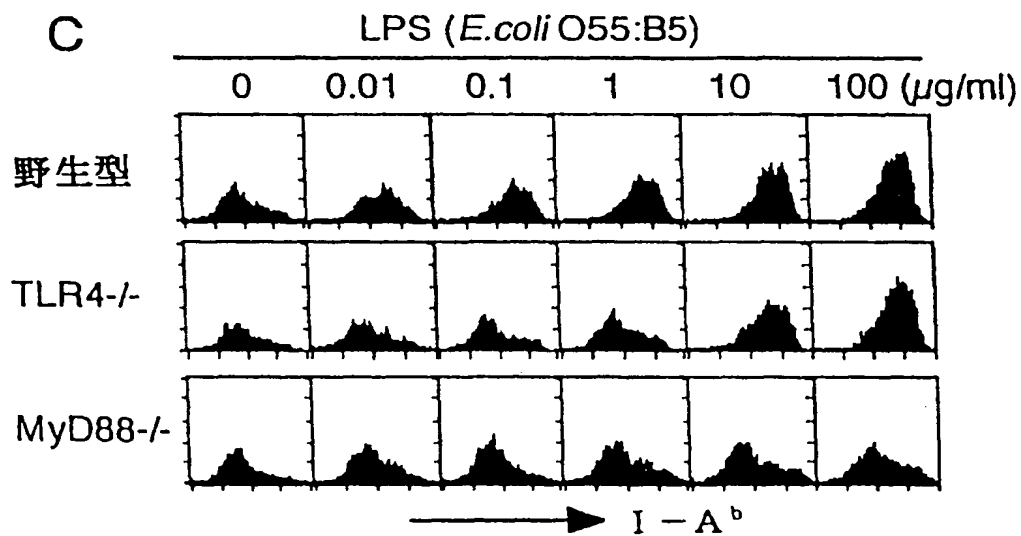
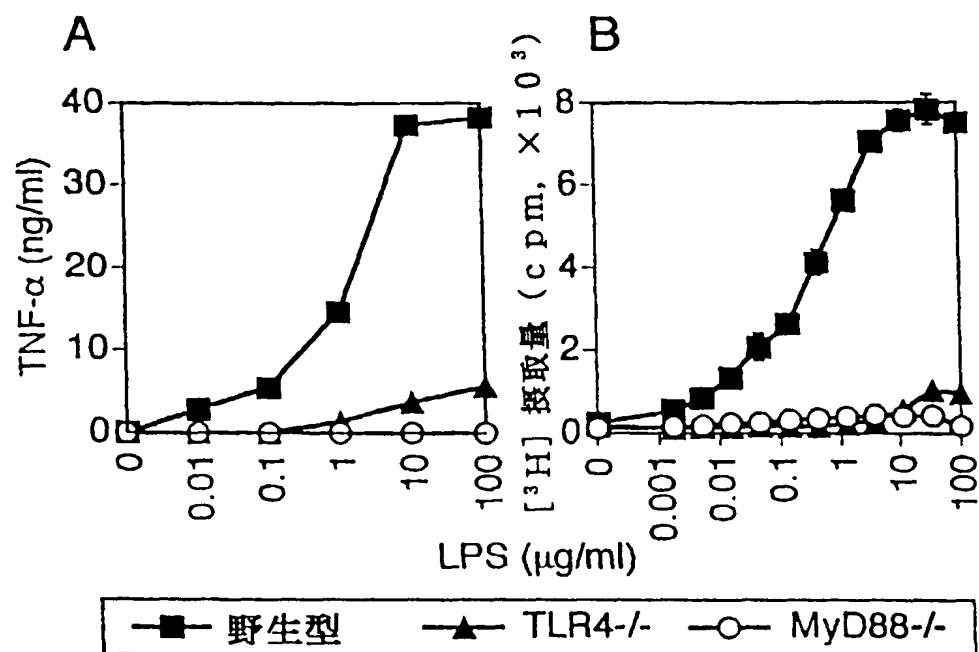
第 9 図

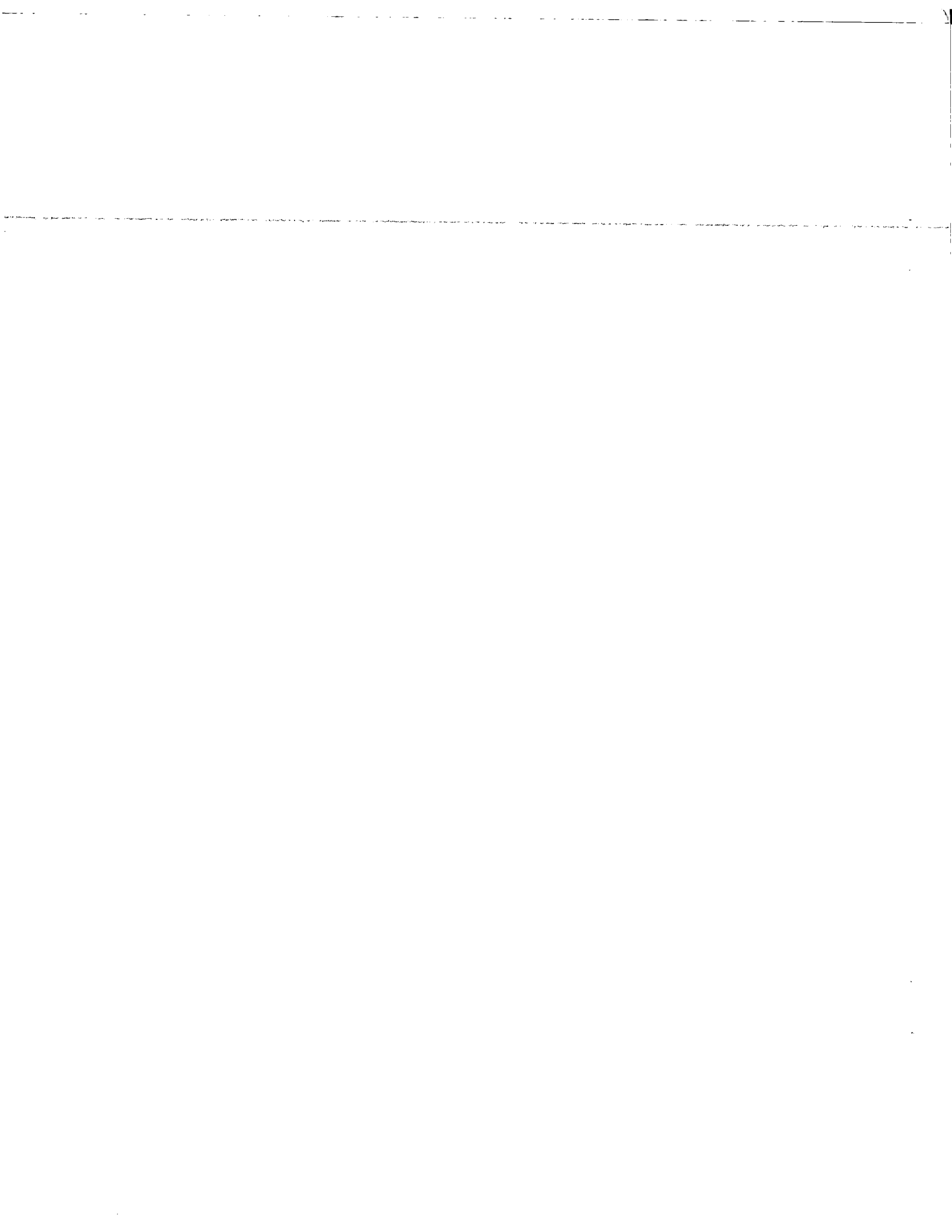


第 10 図

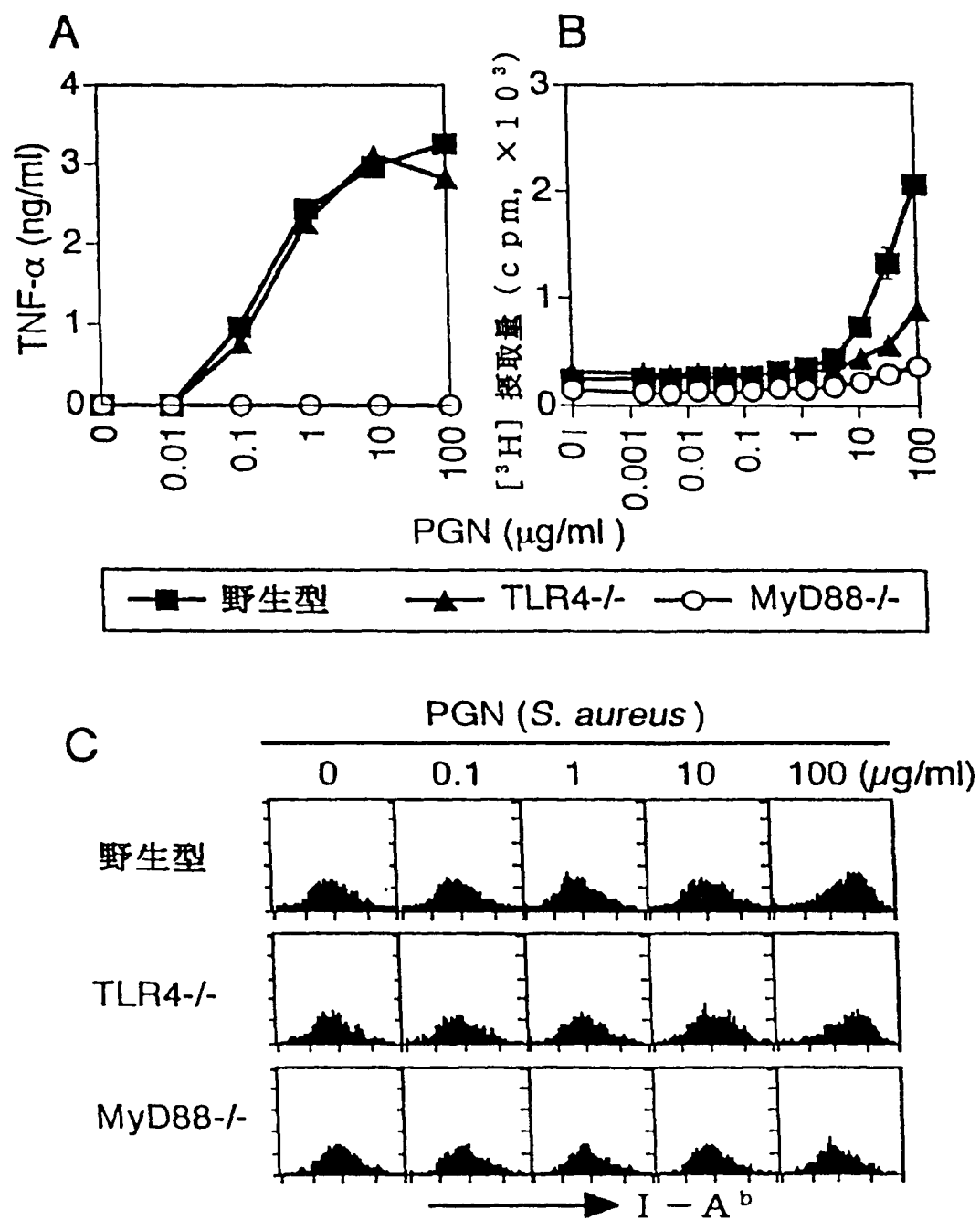


第 11 図

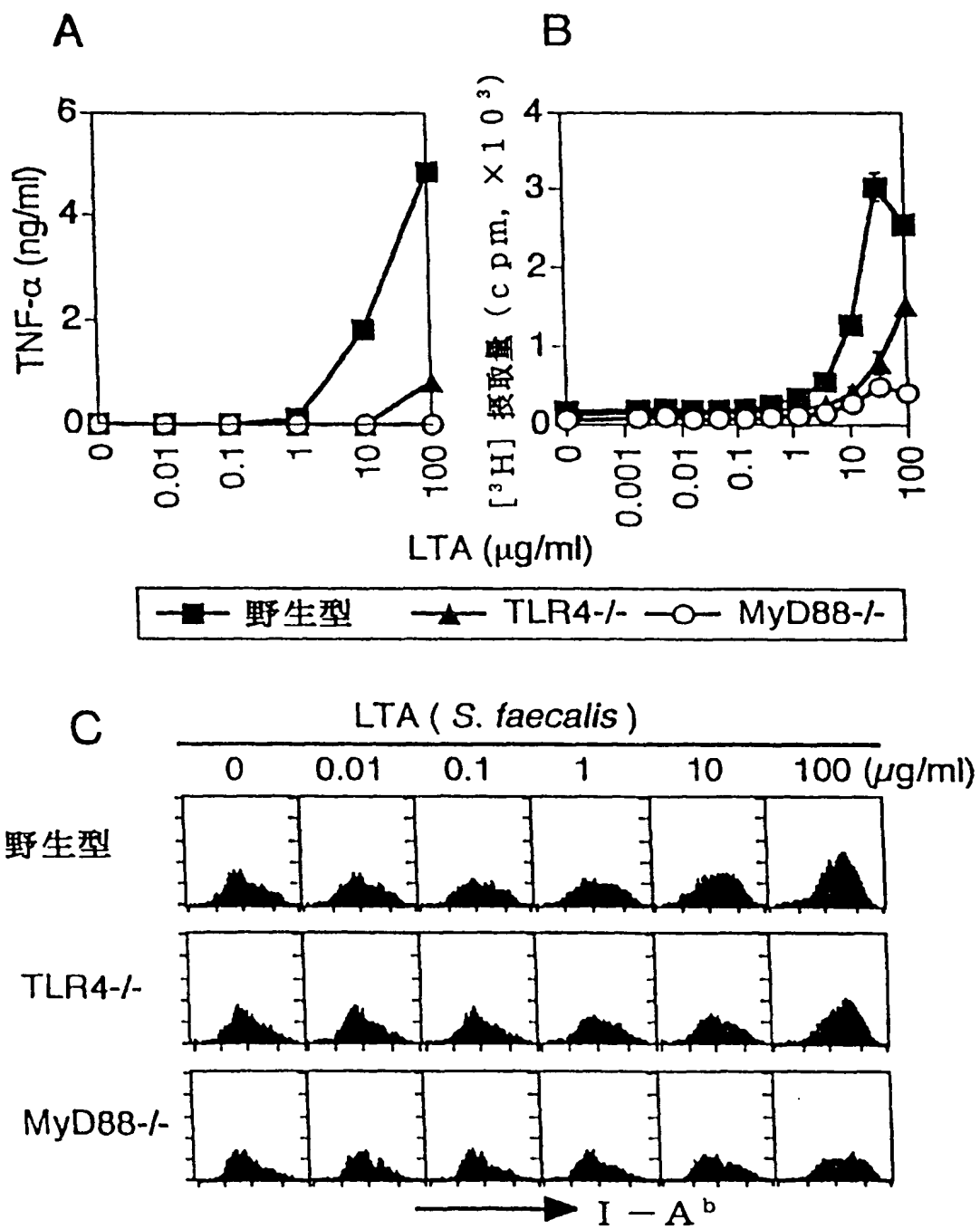




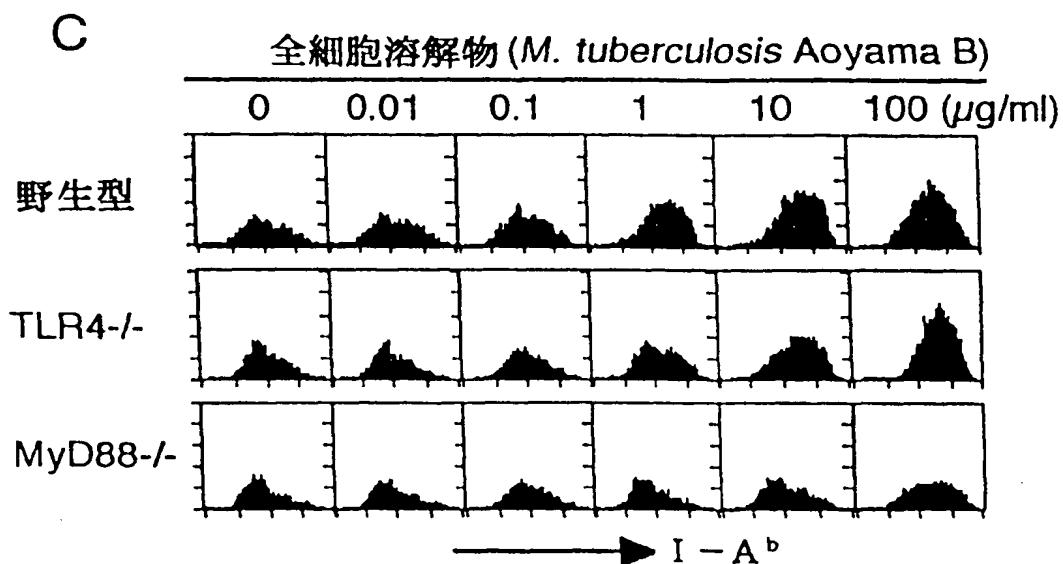
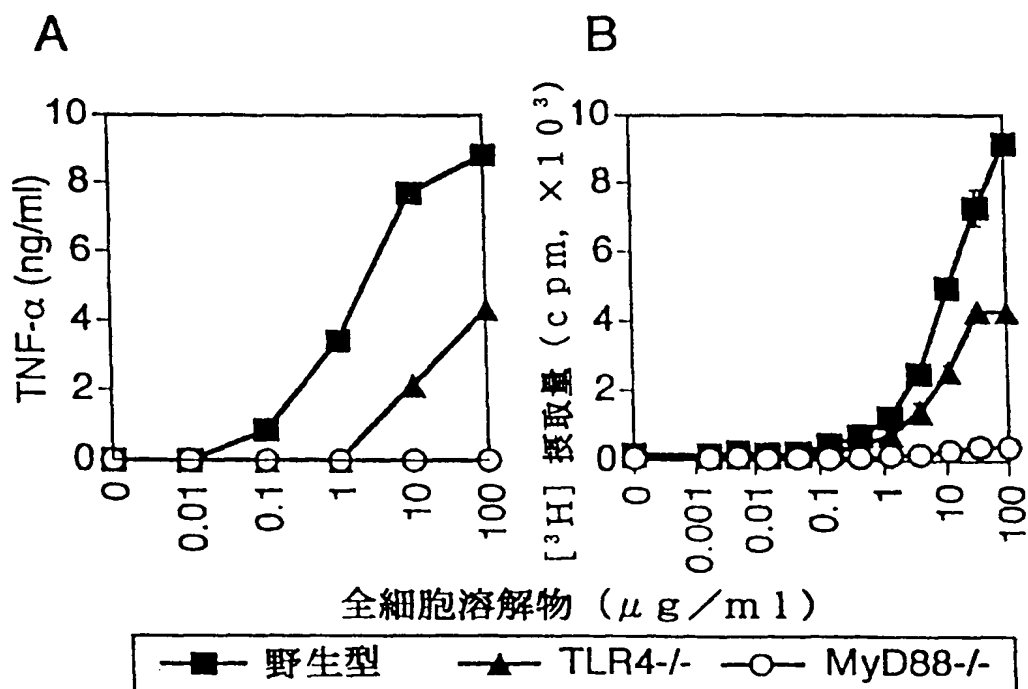
第 12 図



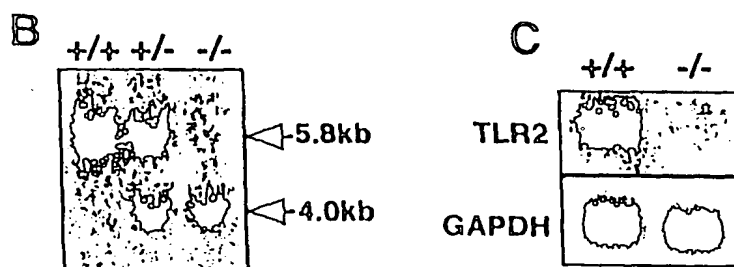
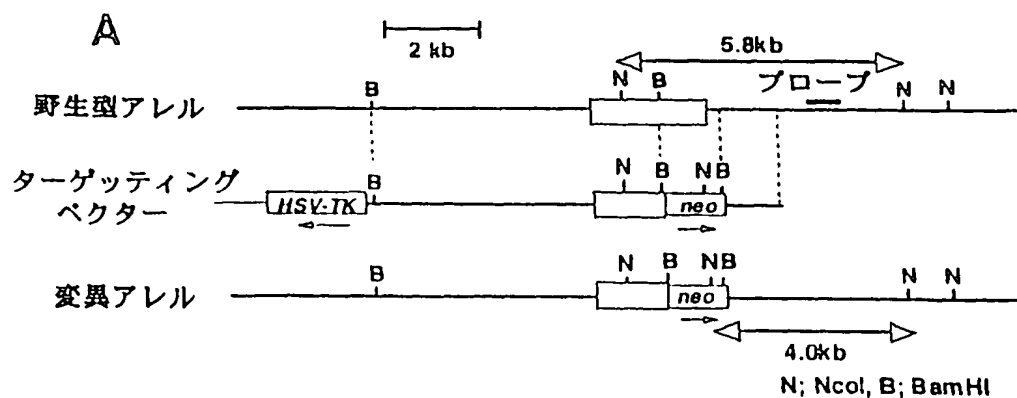
第 13 図



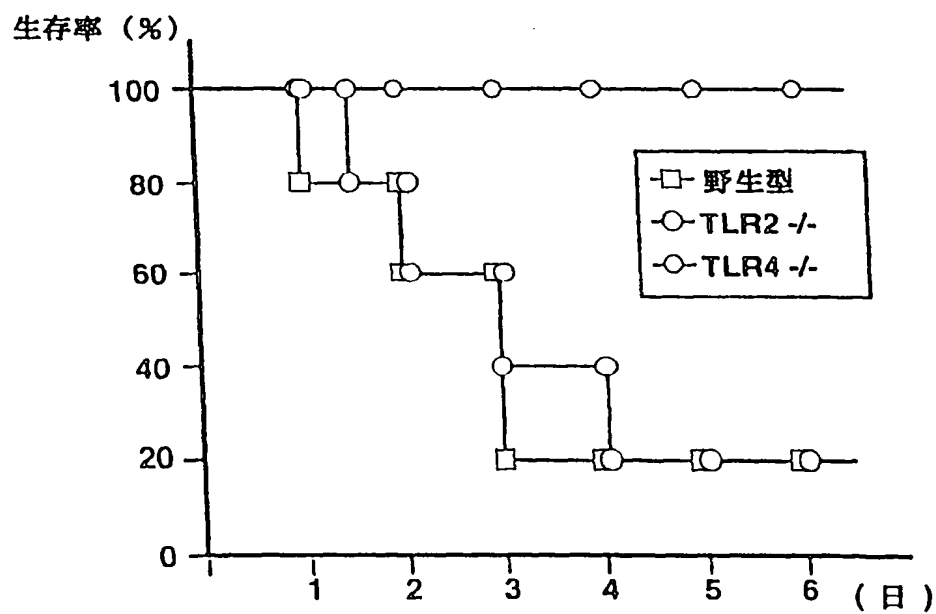
第 1 4 図



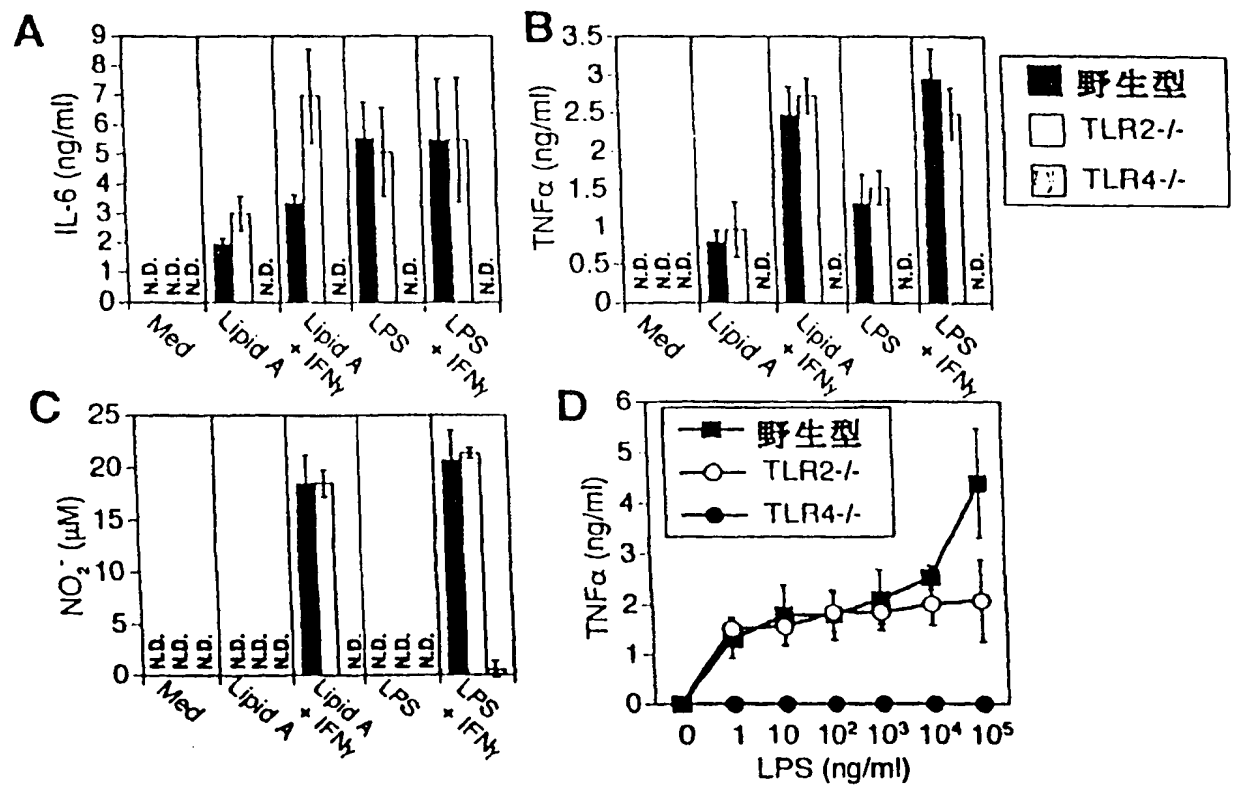
第 15 図



第 16 図

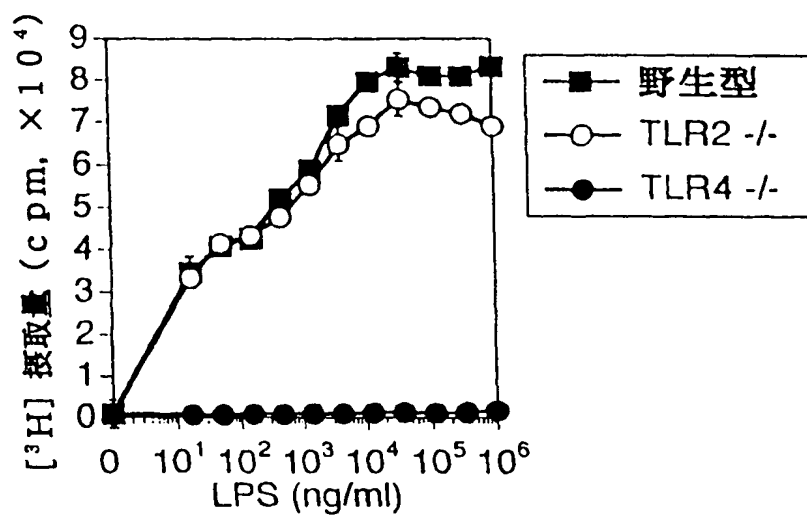


第 17 図

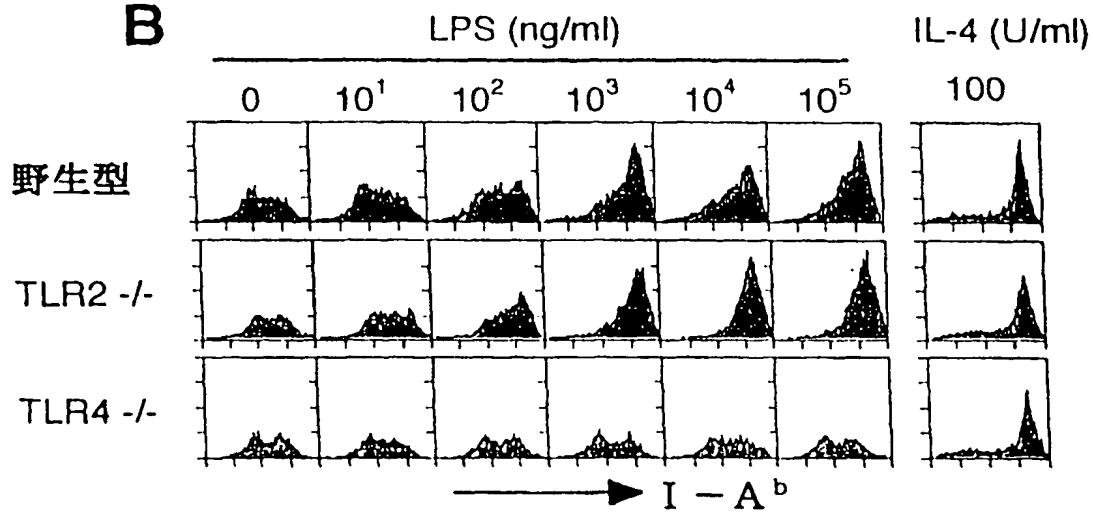


第 18 図

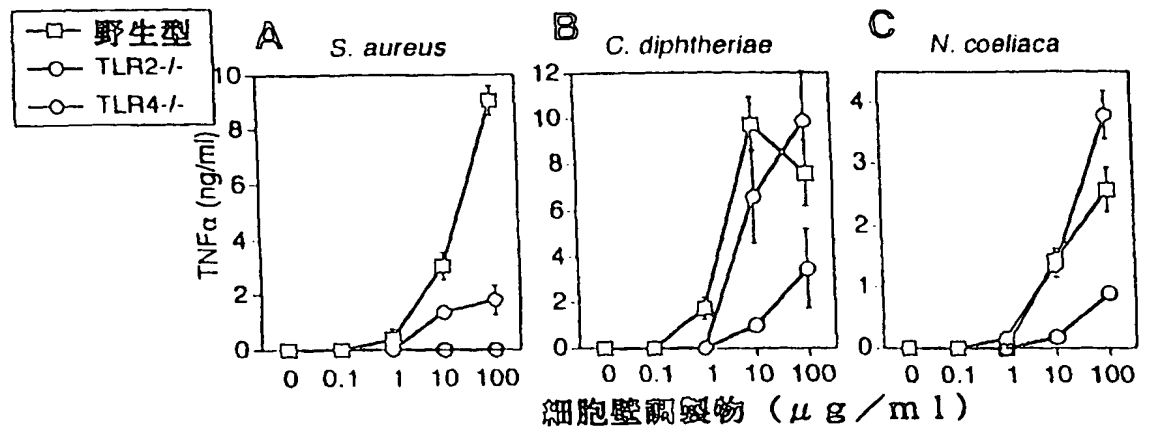
A



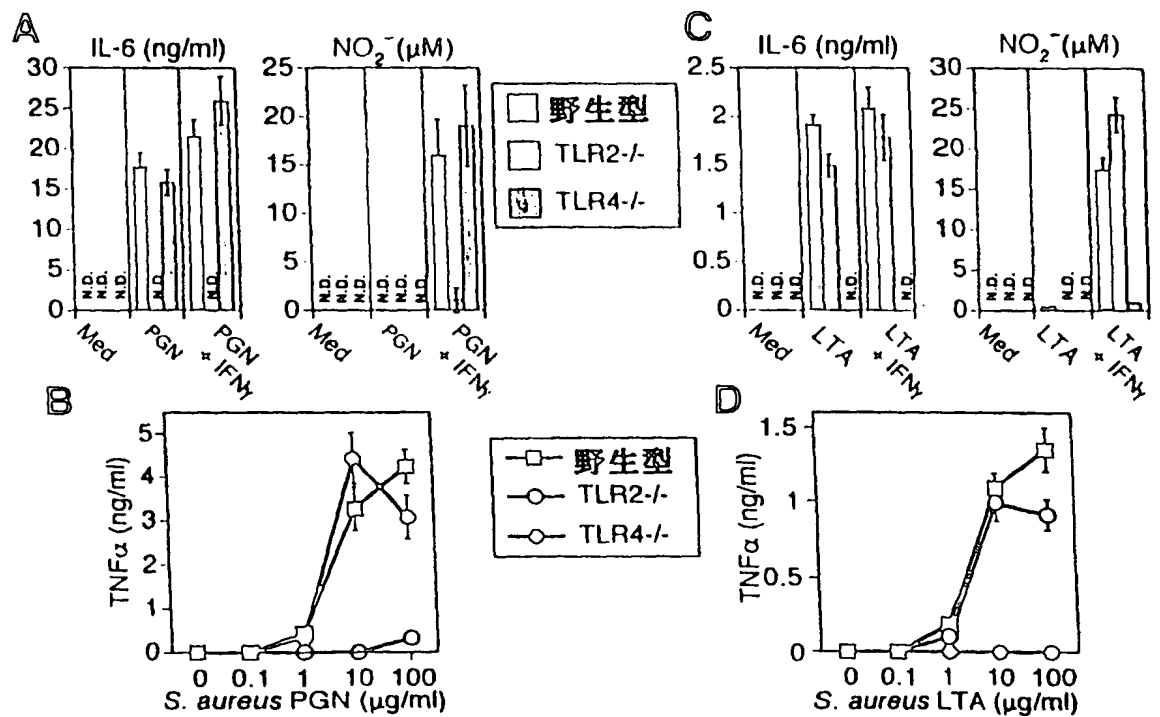
B



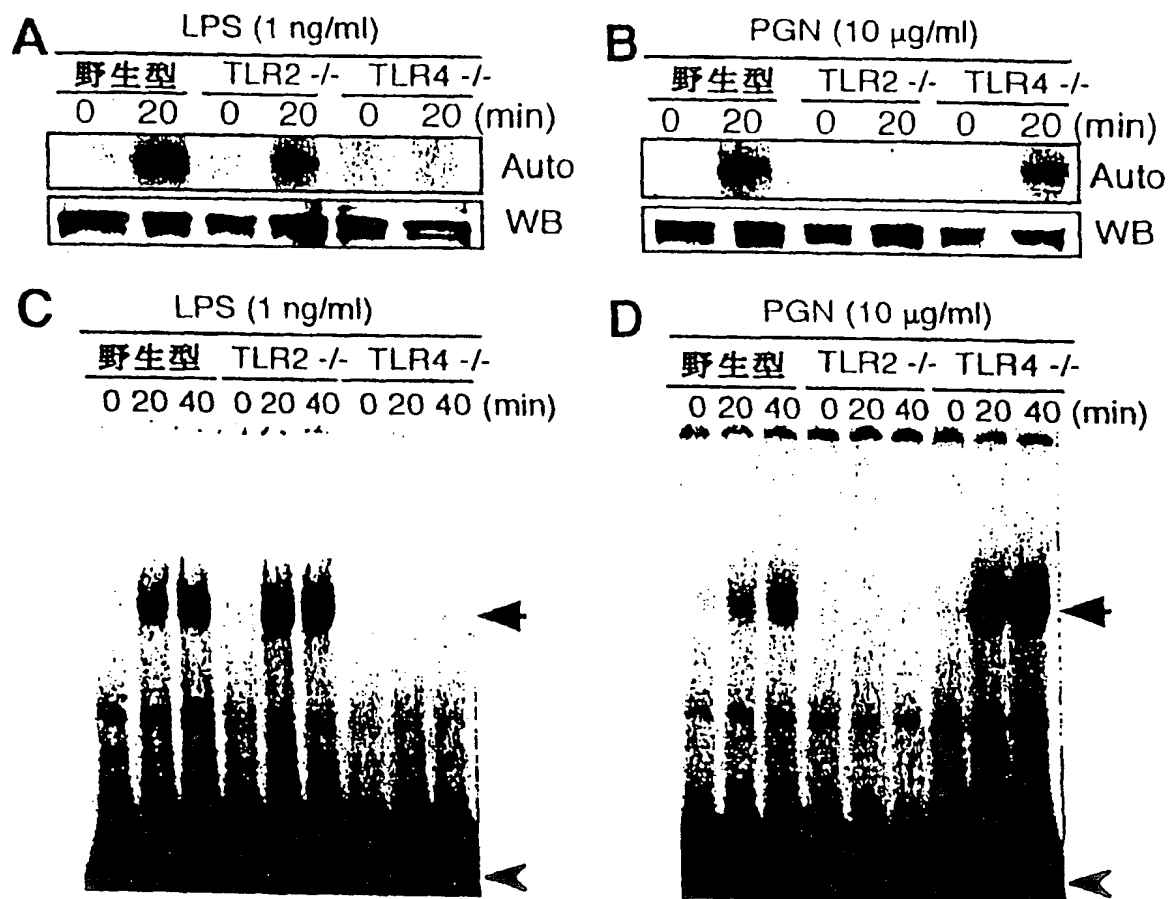
第 19 図



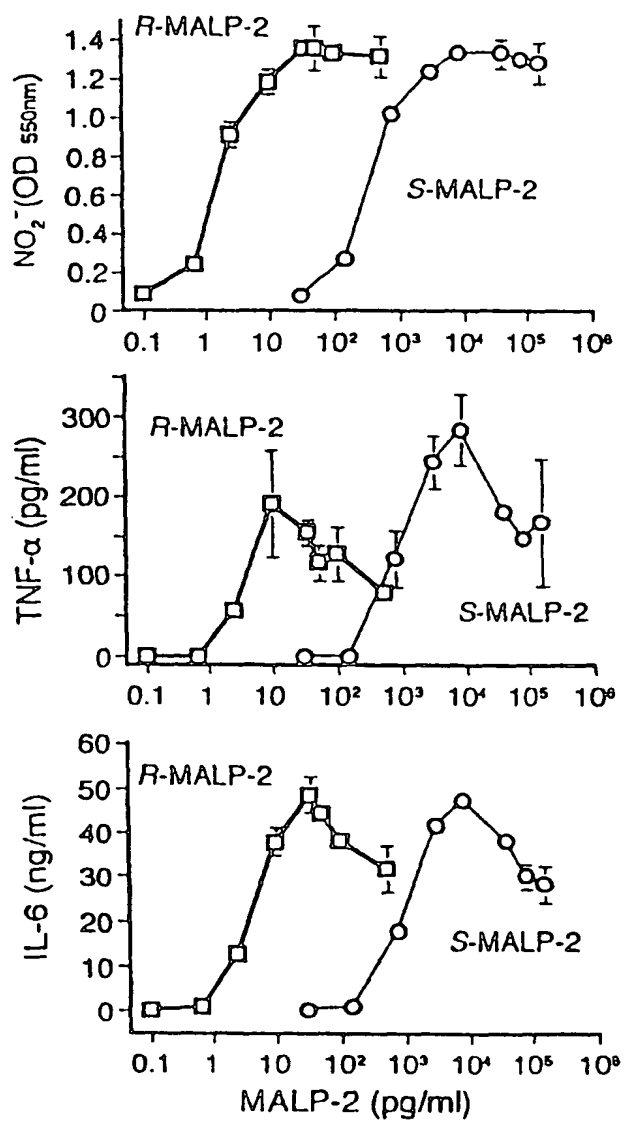
第 20 図



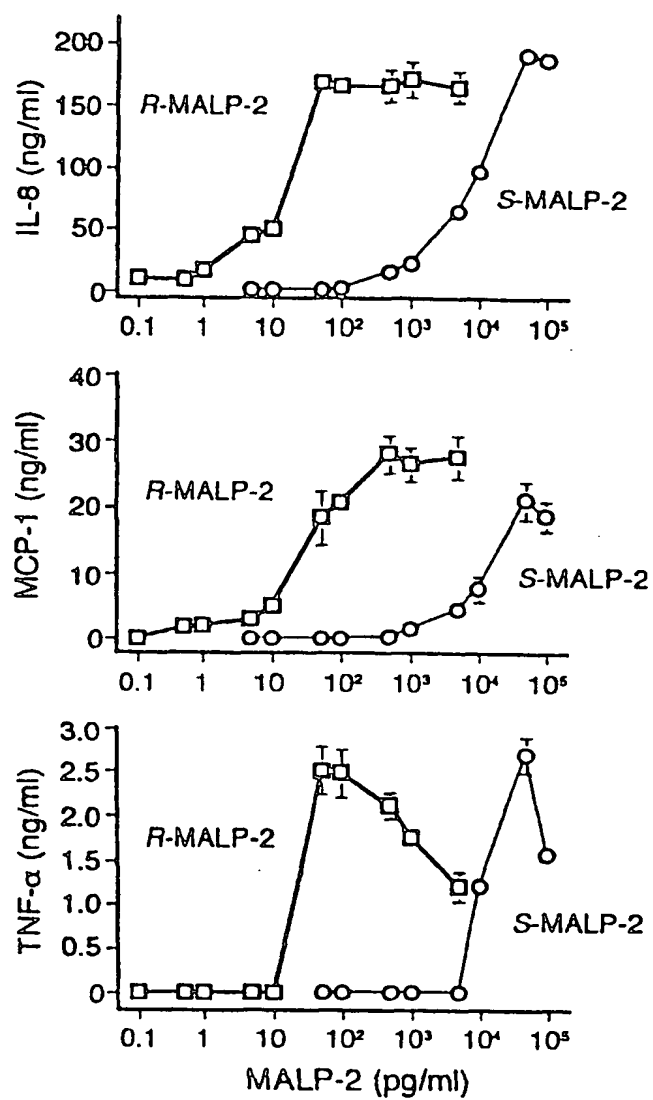
第 21 図



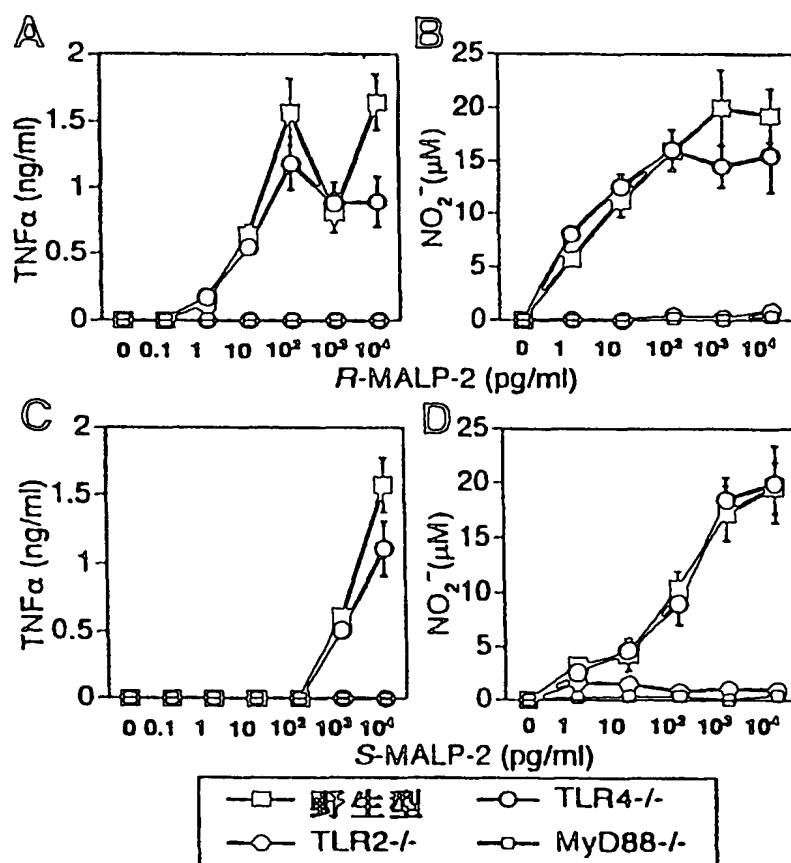
第 22 図



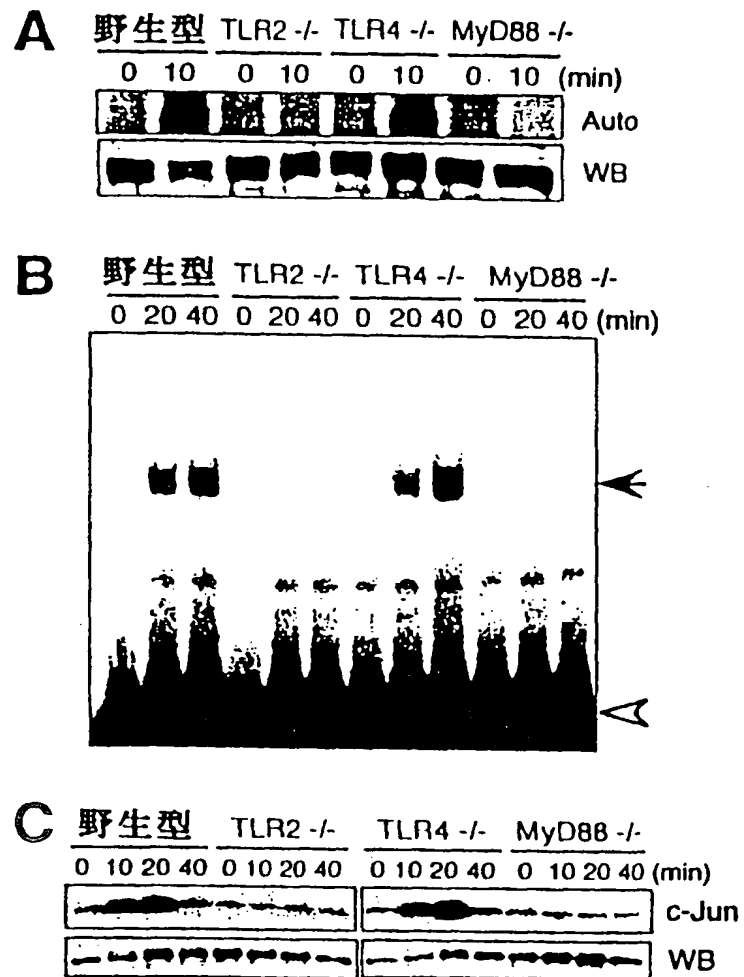
第 2 3 図



第 24 図



第 25 図



開示の日 1998年 7月16日
 (16, 07, 98)
開示の場所 Immunity, Volume 9 Number 1
 July, 1998
開示の種類 論文発表
 Presentation by papers

開示の日 1998年10月30日
 (30, 10, 98)
開示の場所 日本免疫学会・学術年会記録(1998)第28巻
 Proceedings of the Japanese
 Society for
 Immunology, Volume 28, 1998
開示の種類 学会発表
 Presentation at the Institute's
 Meeting
学会の名称 日本免疫学会
 The Japanese Society for
 Immunology

開示の日 1998年11月25日
 (25, 10, 98)
開示の場所 第21回 日本分子生物学会年会
 プログラム・講演要旨集
 Proceedings of the 21th Annual
 meeting of the
 Molecular Biology Society of Japan
開示の種類 学会発表
 Presentation at the Institute's
 Meeting
学会の名称 日本分子生物学会
 The Molecular Biology Society of
 Japan

開示の日 1999年10月 1日
 (01, 10, 99)
開示の場所 Immunity, Volume 11 Number 4
 October, 1999
開示の種類 論文発表
 Presentation by papers

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/00132

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ A01K 67/027, G01N 33/50, G01N33/15,
C12N 15/09

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ A01K 67/027, G01N 33/50, G01N33/15,
C12N 15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS, MEDLINE, WPIDS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Osamu A. et al., Immunity, vol.9, p.143-150 (1998)	1-7, 9-11, 35, 36, 51 8, 12-34, 37-50
X Y	Akira S., 日本免疫学会・学術集会記録(1998)第28巻, 第3頁	1-7, 9-11, 35, 36, 51 8, 12-34, 37-50

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.04.00

国際調査報告の発送日

18.04.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長 井 啓 子

電話番号 03-3581-1101 内線 3236

2B

9123

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	河合太郎ら, 日本免疫学会・学術集会記録(1998)第28巻, 第280頁	1-7, 9-11, 35,
Y		36, 51 8, 12-34, 37-50
X	河合太郎ら, 第21回日本分子生物学会年会・プログラム・講演要旨集(1998), 第184頁	1-7, 9-11, 35,
Y		36, 51 8, 12-34, 37-50
PX	Takeuchi O. et al., Immunity, vol.11, p.443-451 (1999)	1-8, 12, 13, 2
PY		6, 50 9-11, 14-25, 27-49, 51
PX	Kawai T. et al., Immunity, vol.11, p.115-122 (1999)	1-7, 9-11, 35,
PY		36, 51 8, 12-34, 37-50
X	Hardiman G. et al., Genomics, vol.45, p.332-339 (1997)	9, 51
X	Yang R-B. et al., Nature, vol.395, p.284-288 (1998)	8, 50
X	Kirsching C.J. et al., J.Exp.Med., vol.188, p.2091-2097 (1998)	8, 50
A	Gerard C. et al., Nature, vol.395, p.217-219 (1998)	1-51
Y	Michalek S.M. et al., Journal of Infectious Diseases, vol.141, p.55-63 (1989)	4, 5
Y	Harbour D.V. et al., Brain,Behavior,and Immunity, vol.1, p.123-133 (1987)	4, 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/00132

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A01K 67/027, G01N 33/50, G01N33/15,
C12N 15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A01K 67/027, G01N 33/50, G01N33/15,
C12N 15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS, MEDLINE, WPIDS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	X Osamu A. et al., Immunity, vol.9, p.143-150 (1998)	1-7,9-11, 35,36,51 8,12-34,37-50
X Y	X Akira S., Japan Immunology Society, Proceedings of academic meeting in 1998, Vol. 28, page 3	1-7,9-11, 35,36,51 8,12-34,37-50
X Y	X Taro Kawai, et al., Japan Immunology Society, Proceedings of academic meeting in 1998, Vol. 28, page 280	1-7,9-11, 35,36,51 8,12-34,37-50
X Y	X Taro Kawai, et al., Collection of programs and Extended Abstracts of lectures, 21st Annual Meeting, Japan Molecular Biology Society, (1998), Page 184	1-7,9-11, 35,36,51 8,12-34,37-50
PX	X Takeuchi O. et al., Immunity, vol.11, p.443-451 (1999)	1-8,12,13,26, 50

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
10 April, 2000 (10.04.00)

Date of mailing of the international search report
18 April, 2000 (18.04.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/00132

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PY		9-11, 14-25, 27-49, 51
PX	/ Kawai T. et al., Immunity, vol.11, p.115-122 (1999)	1-7, 9-11, 35, 36, 51
PY		8, 12-34, 37-50
X	/ Hardiman G. et al., Genomics, vol.45, p.332-339 (1997)	9, 51
X	/ Yang R-B. et al., Nature, vol.395, p.284-288 (1998)	8, 50
X	/ Kirsching C.J. et al., J.Exp.Med., vol.188, p.2091-2097 (1998)	8, 50
A	/ Gerard C. et al., Nature, vol.395, p.217-219 (1998)	1-51
Y	/ Michalek S.M. et al., Journal of Infectious Diseases, vol.141, p.55-63 (1989)	4, 5
Y	/ Harbour D.V. et al., Brain, Behavior, and Immunity, vol.1, p.123-133 (1987)	4, 5